



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

Facultad de Medicina

Departamento de Fisiología y

Farmacología



**INSTITUTO DE
NEUROCIENCIAS
CASTILLA Y LEÓN**

INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS

DE CASTILLA

Y LEÓN

-INCYL-

Presentado por:

MAURICIO ORLANDO NAVA MESA

**EFEECTO DEL BETA AMILOIDE (25 -35) SOBRE LA
RESPUESTA INHIBITORIA MEDIADA POR
CANALES GIRK EN LA SINAPSIS FIMBRIA -CA3
DEL HIPOCAMPO**

Tesis Doctoral dirigida por el Dr. JAVIER YAJEYA PÉREZ y el Dr.

JUAN DE DIOS NAVARRO LÓPEZ

SALAMANCA

2011

"Hay un momento en que todos los
obstáculos se derrumban, todos
los conflictos se apartan,
y a uno se le ocurren cosas que no
había soñado, y entonces
no hay en la vida nada mejor que escribir"
Gabriel García Márquez

AGRADECIMIENTOS

Luego de varios días sin dormir y tras un largo recorrido por los recuerdos (indudablemente activando el hipocampo), solo quiero expresar mi agradecimiento más sincero, a todas aquellas personas que directa o indirectamente me acompañaron en la realización de este trabajo:

A Javier Yajeya, quien aceptó dirigir esta tesis. Una persona a quien admiro como científico, profesor y sobre todo por su calidad como ser humano. Muchas gracias por aceptarme en tu laboratorio, por tu apoyo y por tu disponibilidad siempre que así lo requerí. De nuevo, mil gracias Javier.

Juande, quien antes que un director de tesis, te has convertido en un gran amigo. Mil gracias por enseñarme, por animarme a continuar con la electrofisiología y por tu ayuda en los momentos de duda. No hay palabras para agradecerte.

A Lydia, gracias por tu amistad, por tu confianza y tu alegría. Me has demostrado que el que persevera finalmente alcanza.

A las personas que hacen parte del laboratorio de Neurofisiología: a Marga y Ade la por su alegría, José Mari, Javi Blanco, Javi De la Fuente por su buena disponibilidad y confianza, y a Noelia por su amistad, su colaboración técnica y compañía en las mañanas. Gracias a todos por su ayuda.

A los profesores del Instituto de Neurociencias y a su director Miguel Merchan, fue un periodo académico muy enriquecedor.

A mis amigos de Salamanca, quienes se han convertido en parte de mi familia: Ernesto Fuscini (Che), Roger (el profesor), Andrés (Andy), Edivan (Edivao) y Katherine (Kathy).

A mis amigos de siempre, Cata, Caro Diago, Arturo (Don Ramón), Carlitos (Charly) Carlos Silva, Gabriel, Angelita, Virgil y Angélica.

A mi familia, mi madre, mi hermano, mis tías y primos (as) y a mi padre que descansa en paz, muchas gracias por brindarme su apoyo desde la distancia. Sin ustedes no habría podido continuar. A Carolina, mi novia, quien gracias a ella tuve la estabilidad emocional necesaria para mantener la racionalidad.

Gracias a todas las personas a quien pude omitir, no por desagradecimiento, si no más bien por despiste y/o amnesia. Muchas gracias a todos lo que hicieron posible este trabajo.

ABREVIATURAS

A1	Amplitud Potencial de Acción
ADP	Postdespolarización
APP	Proteína Precursora del Amiloide
AMPA	-amino-3-hidroxi 5-metil-4-isoxazolepropionato
AMPc	Adenosín Monofosfato Cíclico
AMP	adenosin monofosfato
ANOVA	Análisis de la Varianza
A	Péptido Beta Amiloide
CA	Cornu Ammonis (hipocampo)
Ca²⁺	Iones Calcio
Cl-	Iones Cloro
Cdk5	quinasa dependiente de ciclina 5
CRF	Factor Liberador de Corticotropina
comm	fibras comisurales
CNQX	6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona
D-APV	D-(-)-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid
DAG	diacilglicerol
DC	Corriente Directa
DG	Giro dentado
EA	Enfermedad de Alzheimer
E_{CL}	Potencial de equilibrio para el Cloro
E_I.PIPS	Potencial de inversión para el PIPS tardío
E_e.PIPS	Potencial de inversión para el PIPS temprano
fi	fimbria.
fAHP	Posthiperpolarización rápida
g	capa de células granulosas
GABA	ácido - aminobutírico
GIRK	G protein-coupled inwardly rectifying K ⁺
I_{AHP}	Corriente de posthiperpolarización
I_A	Corriente transitoria de salida
I_C	corriente de potasio activada por calcio
I_D	corriente retardada altamente sensible a 4-AP

Abreviaturas

I_K	corriente de potasio rectificadora tardía
I_{K(ATP)}	corriente de potasio sensible a ATP
I_M	corriente M
IP3	inositol trifosfato
IRK	Classical Inwardly Rectifying K ⁺
IS	Interneurona Selectiva: Interneuron selective
K⁺	Ión Potasio
KIR	Canales de Potasio Rectificadores
KCTD	Potassium channel tetramerization domain -containing
LM	Neuronas Lacunosum-moleculare
LTD	Long Term Depression- Depresión a Largo Plazo
LTP	Long Term Potentiation- Potenciación a Largo Plazo
Luc	Stratum lucidum
M	Mega Ohmios
mAHP	posthiperpolarización media
mV	Milivoltios
mf	Fibras musgosas
ms	milisegundos
mV	milivoltios
Mg⁺	Ión Magnesio
mGluRs	Receptores metabotrópicos de glutamato
MPD	2-methyl-2,4-pentanediol
MS-DBB	Complejo Septum medial - banda diagonal de Broca
nA	nanoamperios
nM	nanomolar
Na⁺	Iones Sodio
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Oxido Nítrico
O-LM	Células Oriens lacunosum-moleculare
Ori	Stratum Oriens
pA	Pico Amperios
PA	Potencial de Acción
PKA	Proteína kinasa A
PKC	Proteína Kinasa C

Abreviaturas

PLC	fosfolipasa
PEPS	Potenciales Excitatorios Postsinápticos
PIPS	Potenciales Inhibitorios Postsinápticos
PP	Vía perforante
PU	Potencial Umbral
Pyr	Stratum Pyramidale
Rad	Stratum Radiatum
Ri	Resistencia de entrada
Sch	colateral de Schaffer
SLM	Stratum Lacunosum-Moleculare
sAHP	Posthiperpolarización lenta
TTX	Tetrodotoxina
μM	Micro molar
Vm	Potencial de membrana

INDICE GENERAL

	Pg
1- INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 HIPOCAMPO.....	2
1.1.1. Neuroanatomía.....	2
1.1.2. Organización Estructural	3
1.1.2.1. Neuronas del Hipocampo.....	5
1.1.2.1.1. Neuronas Piramidales.....	5
1.1.2.1.1.1. Neuronas de CA1.....	5
1.1.2.1.1.2. Neuronas de CA2.....	6
1.1.2.1.1.3. Neuronas de CA3.....	7
1.1.2.1.2. Neuronas Granulares.....	8
1.1.2.1.3. Inter neuronas en el Hipocampo.....	9
1.1.3. Transmisión Sináptica: Principales Neurotransmisores y Receptores	10
1.1.3.1. Glutamato.....	10
1.1.3.2. GABA (ácido gamma amino butírico).....	11
1.1.3.3. Acetil Colina.....	12
1.1.3.4. Monoaminas.....	12
1.1.4. Circuito Tri-sináptico.....	13
1.1.5. Conexiones con el Encéfalo.....	14
1.1.5.1. Proyecciones Aferentes.....	14
1.1.5.2. Proyecciones Eferentes.....	14
1.1.5.3. Proyecciones Comisurales.....	15
1.1.5.3.1. Sinapsis Fimbria-CA3	16
1.1.6. Funciones del Hipocampo.....	17
1.2. RECEPTORES GABAERGICOS.....	19
1.2.1. RECEPTOR GABA A.....	19
1.2.1.1. Características Estructurales y Fisiológicas.....	19
1.2.1.2. Distribución de los Receptores GABA A en el Hipocampo	20
1.2.1.3. Función de los Receptores GABA A sobre la Actividad Neuronal.....	20
1.2.2. RECEPTOR GABA B.....	21
1.2.2.1. Características Estructurales y Fisiológicas.....	21

1.2.1.2. Distribución de los Receptores GABA B en el Hipocampo	23
1.2.1.3. Función sobre la Actividad Neuronal y la Transmisión Sináptica	23
1.3. CANALES DE POTASIO	25
1.3.1. Tipos de Canales de Potasio	25
1.3.2. Efectos de los canales de potasio sobre la actividad neuronal	26
1.3.3. Corrientes de potasio en las neuronas del hipocampo	27
1.3.4. Canales de Potasio acoplados a proteínas Gs	28
1.4. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	29
1.4.1. Introducción.....	29
1.4.2. Epidemiología.....	29
1.4.3. Características Clínicas	30
1.4.4. Déficit Cognitivo Leve.....	31
1.4.5. Fisiopatología.....	31
1.4.5.1. Hipótesis Amiloidea de la EA.....	33
1.4.5.2. Péptido Beta Amiloide y Disfunción Sináptica	34
1.4.6. Efectos del Beta Amiloide sobre la función del hipocampo	37
1.4.6.1. Sistema Septo-Hipocampal y Neurotoxicidad por Beta Amiloide	38
1.4.7. Efectos del Beta Amiloide sobre los canales Iónicos.....	39
1.4.8. Utilidad del Beta Amiloide (25-35) en la investigación Básica de la EA	41
2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	43
2.1. OBJETIVO GENERAL	45
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
3. METODOLOGÍA: MATERIALES Y MÉTODOS.....	46
3.1. Sujetos.....	47
3.1.1. Extracción del Cerebro	47
3.1.2. Preparación de la Pieza.....	47
3.1.3. Extracción de Rodajas	48
3.1.4. Periodo de Incubación.....	49
3.2. Cámara de Registro.....	49
3.3. Sistema de Perfusión.....	49

3.4. Soluciones de Incubación y Registro	50
3.5. Registro Intracelular- Current Clamp.....	51
3.5.1. Electrodo de Registro	51
3.5.2. Electrodo Externo de Estimulación	52
3.5.3. Microscopio y Micromanipuladores	53
3.5.4. Localización de Electrodo y Técnica de registro a Ciegas	53
3.6. Parámetros a Evaluar.....	54
3.6.1. Propiedades pasivas de la membrana.....	54
3.6.2. Propiedades Activas de la membrana	54
3.6.3. Potenciales Sinápticos Provocados	55
3.7. Adquisición y Análisis de las Respuestas Neuronales	57
3.8. Fármacos	57
3.9. Caracterización Morfológica Neuronal	59
3.10. Estadística y Representación Gráfica	59
4. RESULTADOS.....	61
4.1. Caracterización Electrofisiológica de las Neuronas de CA3. Propiedades Intrínsecas.....	62
4.2. Morfología de las Neuronas Registradas en CA3	63
4.3. Caracterización de la Sinapsis Fimbria -CA3. Respuestas Sinápticas en Neuronas de CA3 tras Estimulación Ortodrómica de la Fimbria	65
4.3.1. Respuestas Sinápticas Simples: Potencial Excitatorio e Inhibitorio Postsináptico.....	65
4.3.2. Respuesta Sináptica Compleja: Potencial Excitatorio Postsináptico e Inhibitorios Temprano y Tardío	66
4.3.2.1. Caracterización Mediante Variaciones en la Amplitud del Estimulo Externo.....	67
4.3.2.2. Caracterización de la Respuesta Mediante Variaciones en el Potencial de Membrana en Reposo.....	68
4.3.2.3. Caracterización Farmacológica	69
4.4. Efectos del Beta Amiloide (25-35) sobre las Características Intrínsecas de las Neuronas Piramidales de CA3	71
4.4.1. Potencial de Membrana.....	71

4.4.2. Efectos del A sobre Diferentes Propiedades de la Membrana: Potencial de Acción, Potencial umbral, ADP y AHP	72
4.4.3. Efectos del A sobre el Patrón de Disparo Neuronal	73
4.4.4. Resistencia Interna de la Membrana.....	74
4.5. Efectos del Beta Amiloide sobre la Respuesta Sináptica Inhibitoria Fimbria - CA3.....	75
4.6. Mecanismos Propuestos para Explicar los Efectos del Beta Amiloide (25-35) sobre la Respuesta Sináptica Inhibitoria.....	77
4.6.1. Correlación entre Ri y Componentes Sinápticos	77
4.6.2. Los cambios inducidos por Beta Amiloide (25-35) en la Resistencia de entrada (Ri) pueden estar relacionados con una reducción en la conductancia de los canales GIRK acoplados al receptor GABA B	80
4.6.3. Efectos del Beta Amiloide (25-35) sobre la hiperpolarización mediada por GABAB- GIRK.....	85
 5. DISCUSIÓN.....	88
5.1. Caracterización Electrofisiológica y Morfológica de las Neuronas Piramidales en CA3.....	90
5.2. Respuesta Sináptica Provocada en la Conexión Fimbria -CA3.....	92
5.3. Efectos del Beta Amiloide (25-35) sobre las Propiedades de Membrana	93
5.3.1. Propiedades Pasivas.....	94
5.3.1.1. Efectos del Beta Amiloide (25-35) sobre la Resistencia Interna de la Membrana (Ri)	94
5.3.1.2. Efectos del Beta Amiloide (25-35) sobre el Potencial de Membrana (Vm).....	95
5.3.2. Propiedades Activas	96
5.3.2.1. Efectos del Beta Amiloide (25-35) sobre el Potencial de Acción y la AHP.....	96
5.3.2.2. Efectos del Beta Amiloide (25-35) sobre el Patrón de Disparo.....	97
5.4. Efectos del Beta Amiloide (25-35) sobre la Respuesta Sináptica Provocada Fimbria-CA3.....	98
5.4.1. Respuesta Sináptica Excitatoria	99

5.4.2. Respuesta Sináptica Inhibitoria: PIPS temprano y PIPS tardío	100
5.7. Posible Mecanismo de Acción del Beta Amiloide (25-35) Sobre la Actividad Actividad Inhibitoria Postsináptica	101
6. RESUMEN Y CONCLUSIONES	105
7. BIBLIOGRAFIA.....	109

1. INTRODUCCIÓN

1.1 HIPOCAMPO

El hipocampo es una de las estructuras cerebrales más estudiadas tanto desde el punto de vista anatómico-estructural como funcional. Muchos de los principios de la neurociencia actual han sido descritos inicialmente en el hipocampo; un ejemplo de ello es la potenciación a largo plazo (Long Term Potentiation - LTP) (Bliss y Lomo, 1973; Andersen, 1960), modelo experimental que ha servido de base para entender los mecanismos neurobiológicos del aprendizaje y la memoria (Davis et al., 1992; Cooke y Bliss, 2005; Neves et al., 2008). Por otro lado, mediante las actuales técnicas histológicas de alta resolución y de electrofisiología se conocen algunos detalles en cuanto a las características morfológicas de las células que componen el hipocampo, así como su conectividad y función (Shepherd et al., 2006; Wittner et al., 2007; Kajiwara et al., 2008). Diversos estudios atribuyen a la actividad particular de algunas de sus neuronas y de circuitos intrahipocampales específicos, funciones cognitivas como el aprendizaje, la memoria espacial y la respuesta emocional (O'keefe y Burgess, 2005; O'keefe, 1999; Zaichenko, 2009; Lipp et al., 1999; Brun et al., 2008), esto sin desconocer que la conectividad del hipocampo con el resto del encéfalo es compleja y por lo tanto dichas funciones cognitivas no dependen de la actividad de una estructura aislada del resto del cerebro.

1.1.1. Neuroanatomía

El hipocampo es una estructura ubicada en el lóbulo temporal medial; es reconocido macroscópicamente como una pequeña protuberancia medial en el cuerno temporal del ventrículo lateral. Desde el punto de vista filogenético es una estructura muy antigua si la comparamos con el neocortex; de hecho el hipocampo es parte del allocortex el cual es una estructura laminar similar al neocortex pero con menos capas (Greenstein, 2000). En cuanto a su citoarquitectura el hipocampo como tal, es parte de una estructura mucho mayor denominada formación hipocampal, constituida adicionalmente por el giro dentado, subículo, presubiculo, parasubiculo y la corteza entorrinal (Andersen et al., 2007). Según algunos autores, de acuerdo con la organización de los circuitos intrahipocampales, la formación hipocampal esta dividida en dos: en primer lugar, la región hipocampal, constituida por el giro dentado y los respectivos campos CA3, CA2 y CA1; en segundo, la región retrohipocampal, constituida por el subículo, presubiculo/postsubiculo, parasubiculo y la corteza entorrinal (Cenquizca y Swanson,

2007). De esta manera, el término hipocampo puede ser definido desde varios puntos de vista: desde la anatomía macroscópica elemental hasta la histología y la citoarquitectura.

Por otro lado, la formación hipocampal está interconectada consigo misma y con el resto del encéfalo por medio de un sistema de fibras principales: el haz angular, el sistema fimbria/fornix y las comisuras hipocámpales dorsal y ventral. El haz angular es la vía por la cual muchas fibras de la corteza entorrinal se conectan con el giro dentado, hipocampo y subículo, además de conexiones corticales y subcorticales. Por otro lado, este mismo haz tiene funciones importantes en cuanto al procesamiento de la memoria (Vnek et al., 1995; Andersen et al., 2007). Más adelante serán descritos los detalles anatómicos del sistema fimbria/fornix, así como su función. Por último, las fibras comisurales ventrales pueden conectar campos homotópicos o heterotópicos de la formación hipocampal contralateral, mientras que la comisura dorsal lleva fibras del presubiculo y la corteza entorrinal (Amaral et al., 1984; Laurberg, 1979).

1.1.2. Organización Estructural

Desde el punto de vista citoarquitectónico e histológico, el término hipocampo hace referencia a una región de la formación hipocámpal que implica los campos denominados con la abreviación CA. Dicha abreviación proviene del término *Cornu ammonis* ó Asta de Ammon, recordando los cuernos de carnero del dios egipcio Ammón. Lorente de Nó, dividió esta región en los campos CA1, CA2 y CA3. Dicha subdivisión tiene implicaciones no solo anatómicas, si no funcionales, ya que cada una de estas regiones tiene tanto conexiones como propiedades neuronales diferentes (Fig. 1A y B) (Lorente de Nó, 1934; Andersen et al., 2007). Algunos autores reconocen una cuarta región denominada campo CA4 (Shing et al., 2011; Zhang et al., 2009). Sin embargo, la región CA4 es considerada desde hace varios años como una capa profunda del giro dentado -"área dentata" (Amaral, 1978) y por lo tanto no es frecuentemente denominada como tal.

El hipocampo es una estructura con una organización laminar en la cual se pueden observar varios estratos o capas, fácilmente identificables en el microscopio (Fig. 1C). Ubicado en una zona profunda a la capa de células piramidales se encuentra el *stratum oriens* (Ori). Esta zona contiene las dendritas basales de las células piramidales y algunas clases de interneuronas. El stratum oriens es una región en la cual discurren varias conexiones inter-CA3 y la colateral de Schaffer, la cual conecta CA3 con CA1

(Andersen et al., 2007). En el campo CA3, se encuentra una zona denominada *stratum lucidum* (luc), en la cual las fibras musgosas provenientes del giro dentado generan dos tipos de sinapsis altamente especializadas: una para células piramidales y otra para interneuronas GABAérgicas (Szabadics y Soltesz, 2009). El *stratum radiatum* (rad), se encuentra superficial al *lucidum* en CA3 y a la capa de las células piramidales en CA1 y CA2. Al igual que en el *ori*, en el *rad* discurren interconexiones de CA3 y la colateral de Schaffer. La capa más superficial del hipocampo es el denominado *stratum lacunosum-moleculare* (SLM). En dicho estrato se encuentran las terminaciones de la corteza entorrinal, así como del nucleus reuniens del tálamo medial y un gran número de interneuronas (Andersen et al., 2007). Entre los estratos *rad* y *ori*, se ubican las somas de las células piramidales, así como algunas interneuronas. Esta *capa de células piramidales* (*pyr*) presenta una variación en el tamaño neuronal dependiendo de la ubicación en los diferentes campos CA1 a CA3 (Ishizuka et al., 1995).

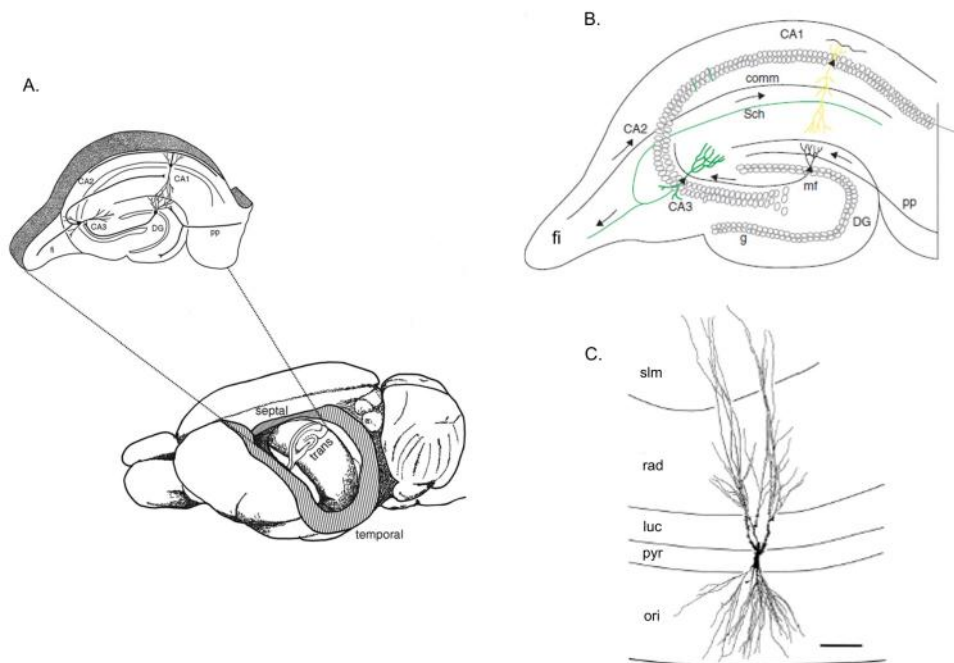


Fig. 1. Representación esquemática del hipocampo y sus partes. A. Localización en el eje septo-temporal y transversal de la formación hipocámpal en el cerebro de la rata. B. En una sección coronal del hipocampo de rata, se muestra cada una de sus vías excitatorias principales. PP. Vía perforante; mf: fibras musgosas; Sch: colateral de Schaffer; comm: fibras comisurales; fi: fimbria. DG: giro dentado; g: capa de células granulosas. C. Representación de una neurona piramidal de CA3, y la distribución de su soma y árboles dendríticos en las capas del hipocampo. Ori: stratum Oriens; Pyr: stratum piramidales; luc: stratum lucidum; rad: stratum radiatum; slm: stratum lacunosum moleculare. (Modificado de Andersen et al., 2007; Hammond et al., 1996; Ishizuka et al., 1995).

1.1.2.1. Neuronas del Hipocampo

Las neuronas del hipocampo podemos dividir las en dos tipos: neuronas principales y neuronas secundarias (*not principal neurons*). Dentro de las neuronas principales de la región hipocampal se encuentran las neuronas piramidales; dichas células se encuentran ubicadas en los campos CA1 a CA3. Por otro lado, en el giro dentado se identifican dos neuronas principales: las células granulares y las células musgosas (*mossy cells*) (Leranth y Hajszan, 2007; Freund y Buzsáki, 1996). En cuanto a las células no principales, la gran mayoría han sido reconocidas como interneuronas de diferentes tipos (Freund y Buzsáki, 1996), teniéndose cierto grado de dificultad para agruparlas por morfología, electrofisiología y receptores de superficie (Parra et al., 1998). A continuación se profundizará en las características morfológicas y funcionales de cada uno de estos tipos celulares.

1.1.2.1.1. Neuronas Piramidales

1.1.2.1.1.1. Neuronas de CA1

Desde el punto de vista morfológico las neuronas piramidales de CA1 se caracterizan por tener un árbol dendrítico homogéneo (estudios “*in vitro*” e “*in vivo*” muestran escasa variabilidad en cuanto a su complejidad dendrítica y número de ramas), así como menor tamaño en comparación con las neuronas de CA3. Dependiendo de sus características morfológicas, diversas propiedades funcionales tales como la eficiencia sináptica, así como sus propiedades biofísicas pueden variar (Pyapali et al., 1998; Komendantov y Ascoli, 2009) indicando una clara correlación entre estructura y propiedades fisiológicas. Dichas características han sido estudiadas profundamente en las neuronas de CA1, sin embargo aplican para los otros tipos de neuronas piramidales. En cuanto a su distribución por estratos, los somas de las neuronas de CA1 se ubican en el stratum pyramidale (pyr), mientras que su dendrita basal se restringe al stratum oriens. La dendrita apical se encuentra en el stratum radiatum y el SLM (Ahmed y Mehta, 2009).

Con respecto a su conectividad, la mayor densidad de espinas dendríticas y sinapsis excitatorias se localiza en el stratum radiatum y el oriens, siendo mucho menor en el SLM. Por otro lado, los segmentos en el soma o cercanos a él, así como al cono axónico tienden a recibir conexiones inhibitorias principalmente (Megías et al., 2001). La principal fuente de aferentes excitatorias para las neuronas de CA1 provienen de las neuronas de CA3, así como de la corteza entorrinal (Ahmed y Mehta, 2009).

Igualmente, se han descrito conexiones con el giro dentado, subículo, presubículo y parasubículo (Cenquizca y Swanson, 2007). En cuanto a su conexión extrahipocampal, se han descrito aferentes excitatorias e inhibitorias del tálamo (núcleo reuniens) y de la amígdala basolateral (Dolleman-Van der Weel et al., 1997; Pikkarainen et al., 1999). Estudios con neurotrazadores, han mostrado que las células piramidales de CA1, envían proyecciones hacia el tálamo, hipotálamo y múltiples áreas extrahipocampales de la corteza cerebral (retrosplenial, cíngulo, orbital, entre otras) (Cenquizca y Swanson, 2006; Cenquizca y Swanson, 2007).

En cuanto a sus características fisiológicas, las neuronas de CA1 tienen potenciales de membrana en el rango de los -60 a -70 mV y resistencia de entrada de 104 (+/-10) M Ω (Spruston y Johnston, 1992). Mediante registro intracelular, y luego de una prolongada inyección de corriente despolarizante, se ha registrado un tren de potenciales de acción con un fenómeno de acomodación de frecuencia, es decir, una reducción en el intervalo inter-espigas a medida que se mantiene la despolarización, fenómeno atribuido a un incremento en la conductancia al potasio (I_M y I_{AHP}) (Madison y Nicoll, 1987; Lancaster y Nicoll, 1987; Staff et al., 2000).

1.1.2.1.2. Neuronas de CA2

Las neuronas piramidales de CA2, desde el punto de vista estructural tienen similitudes con las neuronas de CA3. Es decir, cuentan con un árbol dendrítico extenso, mayor heterogeneidad celular que con respecto a las neuronas de CA1 y una densidad celular similar a CA3. Sin embargo, las células de CA2 no tienen las denominadas excrescencias espinosas (*thorny excrescences*) de las células de CA3. La distribución de la dendrita apical, basal y soma se extienden en los mismos estratos que en las células piramidales de CA1. Igualmente, su axón se extiende por el stratum oriens (Ishizuka et al., 1995; García-López et al., 2007).

En cuanto a conectividad, las neuronas de CA2 reciben aferencias excitatorias de CA3 mediante la colateral de Schaffer. Sin embargo dicha sinapsis no cuenta con las mismas propiedades que las del circuito tri-sináptico giro dentado-CA3-CA1. La diferencia principal está en la dificultad para generar LTP en tal conexión, fenómeno atribuido a ciertas proteínas de señalización que modulan la sinapsis (Lee et al., 2010). Así mismo, las neuronas piramidales de CA2 reciben una gran aferencia excitatoria de la corteza entorrinal, en contraste con una más débil conexión proveniente de CA3. Dicha variación en sus aferencias (fenómeno conocido como plasticidad de sináptica), junto

con una alta actividad excitatoria desde CA2 sobre las neuronas de CA1, le atribuyen un papel importante en los procesos de memoria (Chevalleyre y Siegelbaum, 2010). Así mismo, estudios histológicos han descrito que puede existir una innervación adicional desde la corteza entorrinal sobre CA2 con respecto a CA3 por la vía perforante (Ding et al., 2010). Por otro lado, las células de CA2 tienen una alta innervación del núcleo supramamilar del hipotálamo posterior (Haglund et al., 1984); dichas proyecciones finalizan sobre la capa de células piramidales, sin una clara evidencia de conexión recíproca.

Por último, existen escasos estudios sobre la actividad electrofisiológica de las células piramidales de CA2. Sin embargo, en un reciente estudio “*in vitro*” en tejido derivado de pacientes con epilepsia del lóbulo temporal, se han realizado registros intracelulares de las neuronas piramidales de CA2. Independiente de los efectos derivados de la condición patológica, las neuronas de CA2 presentan propiedades similares con respecto a células piramidales de otros campos hipocámpales; esto es, potenciales de membrana alrededor de los 71,9 mV (+/- 3,9), resistencia de entrada de 25,6 M Ω (valores mucho menores que en otros tipos de neuronas piramidales) y potenciales de acción de una amplitud aproximada de 90 mV (Wittner et al., 2009).

1.1.2.1.1.3. Neuronas de CA3

En cuanto a sus características morfológicas, las células piramidales de CA3 tienen una alta variabilidad dependiendo de su posición en el hipocampo. En este sentido, las neuronas de CA3 próximas al giro dentado tienen un árbol dendrítico pequeño, en comparación con las neuronas piramidales cercanas al campo CA2 (Ishizuka et al., 1995). Dicha heterogeneidad también se observa en la longitud del árbol dendrítico en el SLM y resalta diferencias con respecto a las células de CA1. Sin embargo, la posición de la dendrita apical, basal y soma con respecto a los diferentes estratos del hipocampo son iguales a las células piramidales de otros campos hipocámpales (Andersen et al., 2007). Una de las características morfológicas de las neuronas piramidales de CA3, es la presencia de las anteriormente mencionadas excrescencias espinosas, ubicadas en la dendrita apical proximal. Dichas excrescencias son un grupo de espinas dendríticas, cuya aferencia excitatoria principal procede del giro dentado a través de las fibras musgosas (Lauer y Senitz, 2006; García-López et al., 2007). La morfología y desarrollo de tales excrescencias varía dependiendo de los estímulos ambientales, así como de la propia innervación por las fibras musgosas (Bartesaghi y Severi, 2002; Gaiarsa et al., 1992).

Así mismo, las neuronas piramidales de CA3, reciben aferencias de la capa II de la corteza entorrinal a través de la vía perforante (Witter, 1993) y además recibe conexiones desde otras células piramidales de CA3 por medio de las fibras comisurales (CA3 contralateral) y asociativas (CA3 ipsilateral) (Bennett et al., 1994; Chattarji et al., 1989); dichas proyecciones forman una extensa red, que según diversos modelos, sería encargada del procesamiento de la información. Desde el punto de vista extrahipocampal, las neuronas piramidales de CA3 reciben aferencias del núcleo basal de la amígdala (Pitkänen et al., 2000) y del núcleo septal medial - banda diagonal de Broca (MS-DBB) (Gaykema et al., 1990).

Las neuronas piramidales de CA3, generan diversas proyecciones axónicas tanto al hipocampo ipsilateral, como contralateral (específicamente a CA3, CA2 y CA1) y en menor proporción al giro dentado y al núcleo septal lateral (Ishizuka et al., 1990; Wittner et al., 2007). Una de las vías principales de conexión eferente de las neuronas de CA3 es la colateral de Schaffer, cuyas terminales hacen sinapsis con las neuronas de CA1.

Con respecto a sus características electrofisiológicas pasivas, las neuronas de CA3 tienen potenciales de membrana del orden de -55 a 60 mV, con resistencias de entrada entre 81,6 a 135 M Ω dependiendo del estudio. Así mismo, en cuanto a su actividad espontánea dichas neuronas generan potenciales de acción simples, seguido por diferentes post hiperpolarizaciones. Mediante la inyección de corriente despolarizante, se pueden observar diferentes patrones de potencial de acción dependiendo de la magnitud de la corriente inyectada: desde potenciales de acción simples, hasta múltiples potenciales de acción iniciales (descarga en ráfagas), los cuales se acompañan de una amplia y lenta post hiperpolarización (Wittner et al., 2007; Spruston y Johnston, 1992).

1.1.2.1.2. Neuronas Granulares

Las neuronas granulares, son el grupo principal de células ubicadas en el giro dentado, con alrededor de 1 millón de neuronas en algunos roedores (Claiborne et al., 1986; Seress, 1988). Dichas neuronas cuentan con pequeños cuerpos celulares (de 8 a 12 μ m) de morfología ovoide, cuyas dendritas espinosas principales se dirigen hacia la fisura hipocampal (Ribak y Shapiro, 2007). Al igual que algunas neuronas piramidales, su tamaño varía dependiendo de la posición en el giro dentado. De esta manera las neuronas ubicadas cerca a CA1, poseen un árbol dendrítico mucho mayor en comparación con las de ubicaciones más distales (Claiborne et al., 1990).

Las células granulares poseen tres tipos de aferentes principales. En primer lugar, reciben aferencias de las células musgosas a través de las fibras comisurales/asociativas (Buckmaster et al., 1996; Buckmaster et al., 1992). En segundo, recibe aferencias de la corteza entorrinal medial y finalmente, de la corteza entorrinal lateral (Witter y Amaral, 1991). Así mismo, tiene una serie de conexiones aferentes de proyección difusa provenientes del núcleo septal, locus coeruleus, área tegmental ventral y región supramamilar (Andersen et al., 2007)

La vía eferente principal derivada de las neuronas granulares es a través de las fibras musgosas. Dicha vía, es una terminal axónica amielínica que se proyecta a la dendrita apical y basal de las neuronas piramidales de CA3 (Claiborne et al., 1986) y además sobre algunas interneuronas GABAérgicas (Acsády et al., 1998; Wenzel et al., 1997).

Respecto a sus propiedades electrofisiológicas, las células granulares presentan potenciales de membrana entre -64 a -77 mV, y resistencias de entrada mucho más altas que en células piramidales, con valores entre 400 y 560 Mohms. En cuanto al patrón de su potencial de acción, mediante despolarización se observan potenciales de acción simples tardíos (Spruston y Johnston, 1992).

1.1.2.1.3. Interneuronas en el Hipocampo

Las interneuronas del hipocampo tienen un papel regulatorio sobre las células piramidales, así como en la función global del hipocampo. Dichos mecanismos regulatorios incluyen modular el inicio de los potenciales de acción, las corrientes iónicas, la transmisión y plasticidad sináptica, y la actividad oscilatoria del hipocampo (Freund y Gulyás, 1997; Czurkó et al., 2011).

Desde el punto de vista morfológico, se han descrito diversos tipos de interneuronas en el hipocampo. Dichas interneuronas presentan características estructurales así como de conexión que permiten ser clasificadas de la siguiente manera:

En primer lugar, se encuentran las células axo-axónicas (chandelier cells). Dichas células tienen su soma en el mismo estrato donde se ubican los somas de las neuronas piramidales, extendiendo sus prolongaciones hacia los árboles dendríticos de dichas neuronas. La principal característica de este tipo de células es que sus terminaciones se conectan con el axón proximal de las células piramidales. Otro de los tipos de interneurona son las células en cesta (basket cells). Dichas células reciben aferencias excitatorias provenientes de las células piramidales e inervan principalmente el soma y las dendritas proximales de las células piramidales produciendo una gran influencia

inhibitoria (Lee y Soltesz, 2011; Freund y Buzsáki, 1996). Además, de la clasificación por similitud morfológica, otros estudios han empleado la localización y distribución de sus ramas como método para describir y denominar las interneuronas. Ese es el caso de las neuronas O-LM (oriens lacunosum-moleculare cells) y LM (lacunosum-moleculare neurons), cuyas ramas principales predominan sobre algunos estratos del hipocampo. Se han descrito además otras interneuronas dependiendo de la posición y orientación de sus ramas dendríticas y axonales. Ejemplos de este tipo tenemos a las Células Bi estratificadas, las Células Trilaminares Horizontales y Trilaminar Radial. Por último, las neuronas IS (interneuron selective) se han descrito como un tipo de interneurona cuya característica fundamental está en la especificidad con que se conecta con otras interneuronas. Dichas células tendrían un papel en la sincronización de la inhibición (Freund y Buzsáki, 1996; Porter et al., 1999).

Un hallazgo común de todos estos tipos de neuronas es el hecho de que son GABAérgicas y que además presentan un patrón de disparo, caracterizado por múltiples potenciales de acción regulares y de alta frecuencia luego de una prologada inyección de corriente despolarizante (Lacaille y Williams, 1990; Szabadics y Soltesz, 2009).

1.1.3. Transmisión Sináptica: Principales Neurotransmisores y Receptores

1.1.3.1. Glutamato

El estudio de las sinapsis excitatorias, inhibitorias, y en general el sistema de neurotransmisión han sido estudiados en profundidad en el hipocampo. A continuación se presenta un resumen de los principales neurotransmisores y receptores, así como su localización en el hipocampo.

En cuanto a la neurotransmisión excitatoria, el glutamato es uno de los principales neurotransmisores del sistema nervioso (Snyder, 1984; Choi, 1988) y en el hipocampo no es la excepción. Los cuatro tipos de receptores para glutamato AMPA, NMDA, Kainato y sus respectivos receptores metabotrópicos han sido ampliamente descritos en diferentes sinapsis del hipocampo (Muller y Lynch, 1990; Heinemann et al., 1990; Cosgrove et al., 2011; Bloss y Hunter, 2010).

Dentro de los receptores ionotrópicos, los AMPA y NMDA se ubican principalmente en las espinas dendríticas de las células piramidales e interneuronas de CA1 a CA3, teniendo poca expresión a nivel extrasináptico (Racca et al., 2000; Geiger et al., 1995; Monyer et al., 1994). En cuanto a sus propiedades funcionales, los receptores NMDA generan una corriente de entrada lenta mediada por Ca^{2+} y Na^{+} . La activación de dicho

receptor es dependiente de voltaje, ya que su apertura depende de la movilización del ión Mg^{+} por despolarización de la membrana. Por otro lado, los receptores AMPA son permeables a los iones Na^{+} y K^{+} , y median corrientes rápidas. Ambos receptores tienden a estar co localizados de tal manera que una gran despolarización inducida por la apertura del canal AMPA, puede facilitar la apertura del canal NMDA (Hestrin et al., 1990; Bliss y Collingridge, 1993).

En cuanto a los receptores de kainato, múltiples estudios han demostrado la expresión de algunas de sus subunidades tanto en el giro dentado como en la región CA3 del hipocampo y en menor medida en CA1 (Werner et al., 1991; Wisden y Seeburg, 1993; Porter et al., 1997). Los receptores de kainato contribuyen con la despolarización mediada por AMPA, y presenta igualmente tiempos de apertura rápidos, así como una corta desensibilización (Lerma et al, 1993; Lerma, 2003). Por otro lado, los receptores de kainato pueden tener efectos presinápticos y regular la liberación de glutamato dependiendo de la concentración del agonista que activa dichos receptores. Tal fenómeno ha sido descrito en la sinapsis fibra musgosa -CA3 (Rodríguez-Moreno, 2006).

Los receptores metabotrópicos de glutamato, se expresan en CA1, CA3, giro dentado y también en las interneuronas GABAérgicas (Shigemoto et al., 1997). Dichos receptores se encuentran acoplados a proteínas G y modifican la actividad de la fosfolipasa C, así como de la adenilato ciclasa. Sus efectos pueden ser postsinápticos (generando un potencial excitatorio lento e incrementando los niveles de Ca^{2+}) o afectando la liberación de neurotransmisor por efectos presinápticos y extrasinápticos (Scanziani et al., 1997; Yeckel et al., 1999; Fagni et al., 2000).

1.1.3.2. GABA (ácido gamma amino butírico)

Se puede decir que el principal neurotransmisor inhibitorio del hipocampo es el GABA. La enzima encargada de la síntesis de dicho neurotransmisor es la glutamato descarboxilasa (GAD), la cual ha sido empleada como marcador de neuronas (GAD 67) y terminales GABAérgicas (GAD 65). Su expresión varía dependiendo de la actividad neuronal, del grado de neurodesarrollo y de la región del hipocampo (Soghomonian y Martin, 1998; Shetty y Turner, 2001; Maqueda et al., 2003; Shi et al., 2004). La descripción estructural y funcional de los receptores GABA se analizará con detalle más adelante.

1.1.3.3. Acetil Colina

La determinación de la enzima Colina Acetil transferasa, ha permitido identificar diversas terminales colinérgicas en el hipocampo, muchas de ellas provenientes del complejo septum medial-banda diagonal de broca (MS-DBB) (Chao et al., 1982; Swanson et al., 1987). Así mismo, se han identificado receptores nicotínicos y muscarínicos en diferentes células del hipocampo. La activación de los receptores nicotínicos puede tener efectos presinápticos al aumentar la liberación de GABA y de glutamato (Dani, 2001) y también puede tener efectos postsinápticos (mediante corriente excitatoria rápida) en neuronas piramidales (Grybko et al., 2011). Por otro lado los efectos sobre los receptores muscarínicos son múltiples dependiendo de la subunidad (M1-M5). Se han descrito efectos postsinápticos en células piramidales e interneuronas, tales como incrementar la duración del potencial de acción, de despolarizar la membrana e igualmente afectar la excitabilidad neuronal (Pitler y Alger, 1990; Pitler y Alger, 1992; Dasari y Gullledge, 2011). Dichos receptores están acoplados a proteínas G, activan la fosfolipasa C y finalmente, modifican la conductancia de diferentes canales de potasio (GIRK y KCNQ) que explican tales efectos (Brown, 2010; Dasari y Gullledge, 2011). Igualmente se han descrito los efectos presinápticos de los receptores M2 a M5 en neuronas del hipocampo, los cuales afectan la liberación de GABA y la excitabilidad (González et al., 2011).

Dentro de los neurotransmisores que actúan en el hipocampo también se encuentran aquellos derivados de los aminoácidos.

1.1.3.4. Monoaminas

En primer lugar, el hipocampo recibe aferencias noradrenérgicas provenientes del locus coeruleus (Amaral y Witter, 1995) que afectan a las neuronas principales. Las células piramidales del hipocampo expresan receptores beta adrenérgicos. La activación de dichos receptores metabotrópicos puede activar la proteína kinasa A (PKA), modificar la conductancia para canales de potasio dependientes de calcio, y así activar a las neuronas piramidales. Dicha activación al parecer influye en la ejecución de la memoria contextual (Pedarzani y Storm, 1993; Murchison et al., 2011).

El mismo mecanismo de acción ha sido postulado para los receptores dopaminérgicos. De esta manera la activación de los receptores D1 del hipocampo incrementan la excitabilidad de las neuronas piramidales, suprimiendo la posthiperpolarización dependiente de canales de potasio vía PKA (Pedarzani y Storm, 1995). Las aferentes

dopaminérgicas del hipocampo provienen del área tegmental ventral (Amaral y Witter, 1995).

El hipocampo recibe aferentes histaminérgicas de la región supramamilar del hipotálamo. Existen muy pocos datos del efecto de dicho neuromodulador sobre la actividad celular, aunque se ha planteado que puede reducir la frecuencia de disparo de las interneuronas mediante el cierre de canales de potasio tipo Kv (Amaral y Witter, 1995; Atzori et al., 2000). Dicha reducción puede ser un mecanismo que indirectamente module e incremente la actividad de las neuronas piramidales. Por otro lado, la actividad histaminérgica puede afectar indirectamente la actividad global del hipocampo, modulando otros sistemas de neurotransmisión (Luo y Leung, 2010).

Finalmente, las neuronas del hipocampo expresan receptores 5HT para serotonina. Muchas de las aferentes serotoninérgicas provienen del núcleo rafe medial. Dichos receptores además de afectar la actividad neuronal (inicialmente hiperpolarizando y luego despolarizando la membrana), afectan la neurotransmisión glutamatérgica, colinérgica y gabaérgica hacia el hipocampo. La activación de algunos receptores de serotonina al parecer son importantes para la recuperación de la memoria (Andrade y Nicoll, 1987; Ogren et al., 2008).

1.1.4. Circuito Tri-sináptico

El circuito trisináptico hace referencia al conjunto de conexiones conformado por la corteza entorrinal, giro dentado, la región CA3 y CA1. Dicho circuito tiene la característica de ser unidireccional y glutamatérgico. De esta manera, las células piramidales de la corteza entorrinal proyectan sus axones sobre las células granulares del giro dentado por medio de denominada vía perforante. Posteriormente las células granulares proyectan por medio de las fibras musgosas hacia las dendritas apicales de las neuronas piramidales de CA3, y las neuronas de CA3 proyectan a CA1 por medio de la colateral de Schaffer. Finalmente, las neuronas piramidales de CA1 completan el circuito enviando eferentes al subículo, y de allí nuevamente a la corteza entorrinal (Greenstein, 2000; Léranth y Hajszan, 2007). El circuito trisináptico forma parte de un circuito mucho mayor en la formación hipocámpal, donde el subículo es la principal fuente de eferencias subcorticales y la corteza entorrinal hace lo propio con el neocórtex (Andersen et al., 2007). Por otro lado, en cada una de las sinapsis que implica el circuito trisináptico se ha logrado inducir LTP (Bartasaghi, 2004), y además se ha

planteado que dichas conexiones participan activamente en la adquisición y mantenimiento de la memoria espacial (Tonegawa y McHugh, 2008).

1.1.5. Conexiones con el Encéfalo

1.1.5.1. Proyecciones Aferentes

La corteza entorrinal es la principal fuente de proyecciones hacia el hipocampo. La capa 2 de la corteza entorrinal no solo se proyecta al giro dentado, sino que algunos axones de la vía perforante también se conectan con neuronas de CA3 (Leranth y Hajszan, 2007). A su vez, la corteza entorrinal recibe información desde la corteza perirrinal y corteza parahipocampal, estructuras que reciben proyecciones de áreas de asociación unimodales y polimodales (lóbulos parietales, temporales y frontales) (Milner et al., 1998). Se han descrito igualmente proyecciones directas desde la corteza perirrinal a las neuronas piramidales de CA1 (Andersen et al., 2007). Tanto células granulares como neuronas piramidales del hipocampo, reciben proyecciones colinérgicas y gabaérgicas desde el Septum medial/banda diagonal de Broca (MS-DBB) (proyección septohipocampal), histaminérgicas del núcleo supramamilar del hipotálamo, aferencias noradrenérgicas de los núcleos pónicos y locus coeruleus, serotoninérgicas del rafe medial y dopaminérgicas del área tegmental ventral, además del sistema comisural del hipocampo contralateral (Leranth y Hajszan, 2007; Amaral y Witter, 1995). Igualmente, se han descrito aferencias excitatorias provenientes del núcleo reuniens del tálamo sobre interneuronas y neuronas piramidales del hipocampo (Dolleman-Van der Weel et al., 1997). Finalmente, el núcleo basal accesorio de la amígdala envía proyecciones eferentes al SLM de la región CA1. La amígdala se conecta igualmente con otras áreas de la formación hipocampal, entre ellas la corteza entorrinal, subículo y parasubiculo (Pikkarainen et al., 1999).

1.1.5.2. Proyecciones Eferentes

El hipocampo proyecta principalmente a áreas circunvecinas como la corteza entorrinal, subículo y núcleo septal. Así mismo, también puede afectar otras estructuras cerebrales mucho más distantes a través de proyecciones indirectas y circuitos complejos. Entre estas estructuras se destacan el hipotálamo y el neocórtex por sus implicaciones funcionales (Greenstein, 2000; Kandel et al., 1997). Como se mencionó anteriormente, el subículo representa una de las principales vías de salida del hipocampo hacia estructuras subcorticales. Entre estas estructuras se destacan: núcleo mamilar, complejo

talámico anterior, presubiculo, tálamo medial y núcleo accumbens. También es de resaltar sus conexiones con la corteza entorrinal, corteza perirrinal, corteza infralímbica, región septal lateral y corteza retrosplenial (Andersen et al., 2007; Greenstein, 2000). Por otro lado, estudios con neurotrazadores han descrito tres vías eferentes principales desde las neuronas de CA1 hacia diferentes áreas de la corteza. En primer lugar, una vía dorsal que inerva el área retrosplenial. Una vía ventral, que envía ramas hacia áreas somatosensoriales, gustativas, olfativas y viscerales. Así mismo se describen conexiones directas con la amígdala baso lateral por esta misma vía. Finalmente, se describe una tercera vía cortico-subcortical a través del fornix, que pasa por la tectia (en el área olfatoria), corteza del cíngulo anterior y áreas prelimbicas, infralímbicas y orbitales (Cenquizca y Swanson, 2007). Igualmente se han descrito conexiones directas con el área frontal medial e hipotálamo (Amaral y Witter, 1995; van Groen y Wyss, 1990). En el caso de la región CA3, sus proyecciones subcorticales se limitan al núcleo septal lateral, sin una clara evidencia de conexiones directas al neocórtex.

1.1.5.3. Proyecciones Comisurales

Las células piramidales de CA3 envían proyecciones hacia los campos CA1, CA2 y CA3 del hipocampo contralateral. Dichas terminales axónicas hacen sinapsis excitatorias con las espinas dendríticas de las células piramidales y con las interneuronas (Blackstad, 1956, Andersen et al., 2007). Dichas proyecciones discurren a través de la comisura hipocámpal, la cual corresponde con un grupo de fibras transversales en la parte posterior del fornix (Seoane et al., 2008).

Las proyecciones comisurales son más abundantes en los roedores en comparación con los primates. Igualmente, hay claras diferencias en la organización de dichas conexiones. En el caso de los primates, estudios con trazadores han determinado que únicamente la zona rostral del hipocampo, así como una parte del giro dentado son conectadas por fibras comisurales, a diferencia de una extensa conexión rostrocaudal en el caso de los roedores (Amaral et al., 1984).

Las conexiones entre las células de CA3 se realiza a través de fibras comisurales que la conectan con células de CA3 del hipocampo contralateral, o con fibras asociativas que lo conectan con el ipsilateral, conformando una compleja red la cual se ha postulado como moduladora de la actividad neuronal en los procesos de aprendizaje, memoria

espacial y memoria de trabajo (Treves y Rolls, 1992; Bennett et al., 1994; Gilbert y Brushfield, 2009).

1.1.5.3.1. Sinapsis Fimbria-CA3

El complejo fimbria-fornix hace referencia a un grupo de fibras que discurren por la superficie medial del cerebro y que interconecta el hipocampo con el hipotálamo. Igualmente, dicho grupo de fibras conecta áreas subcorticales con la formación hipocampal de manera recíproca, es decir por proyecciones aferentes y eferentes (Purves et al., 2001; Hunsaker et al., 2009). Con respecto a estas áreas, las fibras eferentes anteriores se conectan con el núcleo septal y el núcleo accumbens, y las fibras eferentes posteriores se conectan con el tálamo anterior y el hipotálamo (Canteras y Swanson, 1992; Saint Marie et al., 2010). Las vías aferentes colinérgicas a través del complejo fimbria/fornix provienen principalmente del núcleo septal medial y de la banda diagonal de Broca (aferencia septohipocámpal). Adicionalmente se han descrito aferencias del locus coeruleus y núcleo del rafe (principalmente monoaminérgicas), así como gabaérgicas directas (Amaral y Kurz, 1985; Kermer et al., 1995; Almaguer-Melian et al., 2006).

En cuanto a la respuesta sináptica, existen pocos estudios que evalúen mediante un abordaje electrofisiológico las características de la respuesta sináptica provocada en las neuronas de CA3 tras estimulación de la fimbria. En un estudio clásico realizado por Schneiderman y colaboradores (Schneiderman et al., 1992), la estimulación ortodrómica del fornix y de las fibras musgosas produjo potenciales excitatorios e inhibitorios postsinápticos (PEPS y PIPS) mediados principalmente por receptores glutamatérgicos no NMDA (bloqueado por CNQX) y por receptores GABA A (bloqueados por penicilina y bicuculina). Dicha respuesta tiene un componente bifásico que fue registrado tanto intra como extracelularmente (Fig. 2).

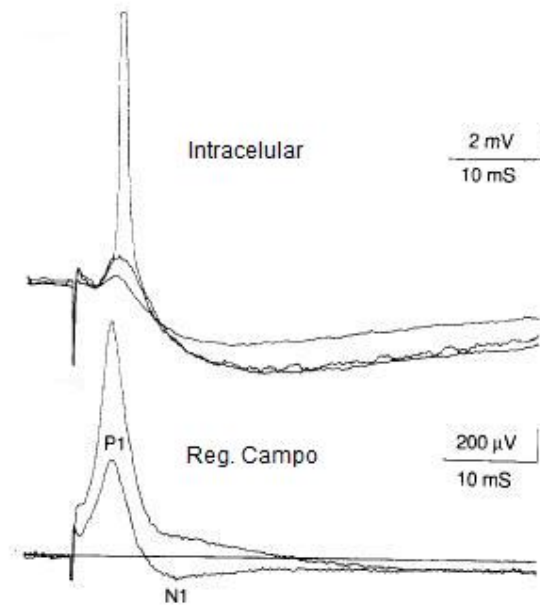


Fig. 2. Comparación de un registro intracelular y de un registro de campo (extracelular) en la región CA3 del hipocampo tras estimulación del fornix. Se observa en ambos casos un PEPS y un PIPS, los cuales incrementan su amplitud en la medida que se incrementa la estimulación (Adaptado de Schneiderman et al., 1992).

En otro estudio, la estimulación eléctrica de la fimbria ventral activó además la sinapsis comisural en las dendritas basales de las neuronas piramidales de CA3. La corriente excitatoria postsináptica provocada, dependía de receptores glutamatergicos tipo NMDA (principalmente la subunidad GluR 2) (Ito et al., 2000). De esta manera, la activación de la sinapsis fimbria-CA3 activa diferentes tipos de receptores glutamatergicos NMDA y no NMDA, así como GABAérgicos.

1.1.6. Funciones del Hipocampo

Una de las principales funciones del hipocampo es el procesamiento de la memoria. Dicho papel fue descrito en detalle a finales del año 57, en un paciente quien fue sometido a la extracción quirúrgica bilateral del hipocampo con el fin de atenuar sus crisis epilépticas. En este paciente, los estudios realizados por Milner y Scoville, evidenciaron una alteración en la capacidad de formar nuevos recuerdos episódicos y además no poder retener información reciente, sin embargo era capaz de recordar eventos de largo plazo (Scoville y Milner, 2000). Los estudios de Milner, llevaron a identificar dos sistemas de memoria diferentes, denominados como memoria declarativa (verbalizable o explícita) y no declarativa (de adquisición inconciente y difícilmente

verbalizable) (Milner et al., 1998). La memoria episódica, así como la memoria de reconocimiento de objetos han sido catalogadas como parte de la memoria declarativa, ambos son un tipo de memoria que depende de la actividad del hipocampo (Passig-Villanueva, 1995; Ergorul y Eichenbaum, 2004; Kart-Teke et al., 2005). Actualmente, el hipocampo ha sido catalogado como una estructura que participa en los procesos de adquisición, mientras que las conexiones cortico-hipocampales participan en la consolidación de la memoria. Por lo tanto, el almacenamiento de la información dependería de la corteza, mientras que al hipocampo se le atribuye la reactivación y organización de dicha información (Aguado-Aguilar, 2001).

Por otro lado, las lesiones en el hipocampo dorsal en roedores se asocian a alteraciones en el procesamiento y ejecución de otro tipo de memoria, la memoria espacial (Broadbent et al., 2004). Igualmente, con el descubrimiento de las “place cells” o células de lugar en el hipocampo, es aceptado actualmente que el hipocampo participa en la codificación y por lo tanto en la navegación espacial. Las células de lugar, son neuronas del hipocampo que incrementan su patrón de disparo dependiendo de la ubicación espacial del animal en su entorno (O'Keefe y Dostrovsky, 1971; O'Keefe, 1999). Igualmente, estudios neuropsicológicos y electrofisiológicos en humanos, han permitido demostrar la participación del hipocampo en las tareas de memoria espacial (Holdstock et al., 2000; Ekstrom et al., 2003).

El sistema límbico, hace referencia a un conjunto de estructuras cerebrales que se encarga de las respuestas fisiológicas ante estímulos emocionales. Las conexiones recíprocas del hipocampo con muchas de estas estructuras (amígdala, corteza prefrontal, hipotálamo y tálamo, entre otras) (Kandel et al., 1997) son importantes para el procesamiento emocional y de hecho, existen trabajos que relacionan el sistema septohipocampal con algunos trastornos relacionados con la respuesta emocional, como por ejemplo la ansiedad (Gray y McNaughton, 2000). Se insiste igualmente que muchas de estas funciones son atribuidas a un conjunto coordinado de estructuras y circuitos, más que a la función aislada del hipocampo.

Además de su participación en las funciones cognitivas, el hipocampo tiene una alta participación en el control endocrino, mediante vías inhibitorias hacia el hipotálamo. El hipocampo se conecta con el núcleo del lecho de la estría terminal, que a su vez envía proyecciones gabaérgicas hacia el núcleo paraventricular del hipotálamo y de esta manera regula negativamente la liberación de diversas hormonas desde la hipófisis. Esta función resulta de un gran interés en términos de la participación del hipocampo sobre

la respuesta al estrés, así como otros efectos comportamentales y fisiológicos (Kollack - Walker et al., 2000; Carrasco y Van de Kar, 2003).

1.2. RECEPTORES GABAERGICOS

1.2.1. RECEPTOR GABA A

1.2.1.1. Características Estructurales y Fisiológicas

El receptor GABA A es una glicoproteína compuesta por varias subunidades, a su vez pertenecientes a siete familias diferentes. En el hipocampo, las principales subunidades corresponden a la $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 5$, $\alpha 3$ y $\alpha 2$ (Hammond, 1996; Sperk et al., 1997). Así mismo, se ha descrito que la mayoría de los receptores GABA A están compuestos por dos subunidades α y dos β , junto con una subunidad γ o una δ (($\alpha 1$)₂($\beta 2$)₂($\gamma 2$)₁) (Farrar et al., 1999). Tanto los dominios que interactúan con el GABA, como la porción que forma el canal iónico son parte de la misma proteína (Hammond, 1996).

Básicamente, el receptor GABA A es un canal ligando dependiente (receptor ionotrópico) con permeabilidad selectiva a los iones de Cloro, así como a Bicarbonato (HCO_3^-). Su función en el sistema nervioso de los vertebrados adultos, es mediar la transmisión sináptica inhibitoria rápida mediante el aumento en la conductancia de Cl^- a través del canal. Este aumento de la permeabilidad y por lo tanto la activación del canal depende de la unión del receptor con dos moléculas de GABA. Por otro lado, también se han descrito funciones no sinápticas, así como efectos excitatorios (Farrant et al., 2007). Experimentos realizados en soluciones fisiológicas con una concentración 10 veces mayor de Cl^- en el lado extracelular frente al intracelular, la corriente mediada por el receptor GABA A tiene un potencial de reversión de aproximadamente -56mV (Bormann et al., 1987). Diferencias en el potencial de reversión, parece explicar efectos paradójicos excitatorios del receptor durante etapas tempranas del desarrollo (Rivera et al., 1999). La exposición del receptor GABA A a concentraciones crecientes y constantes de GABA, produce una disminución en la corriente mediada por este receptor. Por lo tanto dicho receptor presenta un fenómeno de desensibilización que ha sido previamente estudiado (Weiss et al., 1988).

Además de los efectos hiperpolarizantes, mediados por Cl^- , el receptor GABA A puede generar despolarización. El bicarbonato contribuye a las respuestas excitatorias neuronales mediadas por el receptor GABA A en algunas condiciones patológicas (Kim et al., 2009). Por otro lado, la conductancia al bicarbonato en los receptores GABA A,

puede ser un factor importante para mantener el potencial de reversión en neuronas piramidales del hipocampo adulto, la cual es modificable a lo largo del desarrollo (Tyzio et al., 2008).

1.2.1.2. Distribución de los Receptores GABA A en el Hipocampo

Estudios inmuno histoquímicos, han revelado la distribución heterogénea de las diferentes subunidades de los receptores GABA A en el hipocampo, así como en giro dentado. En cuanto a este último, se han detectado altas concentraciones de las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 3$, $\alpha 2$ y $\alpha 1$ en las dendritas de las células granulares. En el estrato radiado y oriens de los campos CA1, CA2 y CA3 se han detectado grandes concentraciones de las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 5$, $\alpha 3$ y $\alpha 2$. Esto podría indicar una expresión predominante de dichas subunidades en la dendrita apical y basal de las células piramidales antes que en el soma. A diferencia de CA1 y CA3, en el campo CA2 se expresa principalmente la subunidad $\alpha 1$ (Sperk et al., 1997). Independiente de esta distribución heterogénea de las subunidades, las corrientes inhibitorias mediadas por la activación de los receptores GABA A pueden ser inducidas a nivel del árbol somato dendrítico y en el segmento inicial del axón de las células piramidales (Maccaferri et al., 2000) por estimulación de las interneuronas. De esta manera es posible afectar la excitabilidad neuronal, así como el patrón de disparo de las neuronas piramidales. Los receptores GABA A también cuentan con una expresión heterogénea de sus subunidades dependiendo del tipo de interneurona. Algunas interneuronas del giro dentado presentan un predominio en la expresión de las subunidades $\alpha 2$, $\alpha 3$ y $\alpha 2$, mientras que $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 2$ predominan en hipocampo, aunque existen pocos estudios al respecto (Wang et al., 2011; Mangan et al., 2005; Berger et al., 1998).

1.2.1.3. Función de los Receptores GABA A sobre la Actividad Neuronal

La activación de los receptores GABA A puede generar diferentes tipos de corriente dependiendo del potencial de equilibrio para el Cl^- (E_{CL}). En este sentido, si el E_{CL} es más negativo que el potencial de la membrana (V_m), la activación de estos receptores produce una corriente hiperpolarizante y por lo tanto inhibición de la actividad postsináptica. Dicho efecto inhibitorio sobre la actividad excitatoria, así como sobre los potenciales de acción se da incluso cuando E_{CL} es parecido al V_m , en un fenómeno descrito como inhibición silente (Silent Inhibition) (Hammond, 1996). De esta manera, la activación de los receptores GABA A puede generar un freno para las respuestas

excitatorias mediadas por receptores glutamatérgicos. De hecho hay evidencia de co-expresión GABAérgica en la sinapsis glutamatérgica fibra musgosa -CA3 (Gutierrez, 2003) que regula dicha conexión. Por otro lado, en estadios tempranos del desarrollo, los efectos de la activación de los receptores GABA A pueden ser excitatorios debido a las altas concentraciones de Cl^- intracelular. Dicha despolarización mediada por GABA A puede tener un papel importante en la formación de los circuitos cerebrales (Ben-Ari et al., 1997).

Como anteriormente se mencionó, la mayoría de las interneuronas del hipocampo son GABAérgicas. De esta manera la activación de los receptores GABA A en las neuronas piramidales del hipocampo, a su vez regulado por la actividad de las interneuronas, induce una actividad oscilatoria en el potencial de membrana de dichas células. Dicha actividad oscilatoria es conocida como ritmo theta, y al parecer tiene un papel importante en los procesos de aprendizaje y memoria (Losonczy et al., 2010; Nishiyama et al., 2010; Czurkó et al., 2011).

1.2.2. RECEPTOR GABA B

1.2.2.1. Características Estructurales y Fisiológicas

Mediante estudios de purificación, y utilizando su afinidad al Baclofen, el receptor GABA B ha sido identificado como una proteína de 80 kDa (Nakayasu et al., 1993). El receptor GABA B es un receptor metabotrópico acoplado a proteínas G (Ohmori et al., 1990) que está conformado por dos subunidades B1 y B2; las cuales a su vez tienen varias isoformas B1a y B1b y se acoplan para constituir dos tipos de receptores GABA (B(1a,2)) y GABA (B(1b,2)). Datos recientes han descrito que los receptores GABA B se encuentran acoplados a un complejo macromolecular, junto a la familia de proteínas KCTD (potassium channel tetramerization domain-containing). Dicha variedad en las subunidades así como su acople a este complejo proteínico, parecen explicar la heterogeneidad de las respuestas del receptor GABA B. (Pinard et al., 2010; Schwenk et al., 2010). De esta forma, el funcionamiento del receptor depende de su heterodimerización, así como de la formación de un gran complejo macromolecular de señalización (Padgett y Slesinger, 2010). En otra nomenclatura, las subunidades del receptor GABA B se han catalogado como R1 y R2. La subunidad R1 parece ser la responsable de la interacción con el ligando así como a los agonistas, mientras que la R2 interactúa con el complejo de señalización intracelular (Rondard et al., 2008).

Como se mencionó anteriormente, los receptores GABA B están acoplados a diferentes tipos de proteínas G (Gi/Go y Go- sensible a la toxina pertusis), los cuales a su vez tienen varios efectores intracelulares. En este caso, la activación de este tipo de proteínas G modulan la actividad de la adenilato ciclasa de forma variable y así mismo modifica diferentes segundos mensajeros. Además, se ha descrito que diversos lípidos (lípid rafts), proteínas estructurales (scaffold proteins) y porciones del mismo receptor, contribuyen con su función (Padgett y Slesinger, 2010). La estimulación de los receptores GABA B, activan las proteínas Gi y reducen la actividad de la adenilato ciclasa y los niveles de AMPc; igualmente reducen la conductancia de los canales de Ca^{2+} , y por otro lado abren los canales de potasio tipo GIRK (G protein-coupled inwardly rectifying K^+) (Xu y Wojcik, 1986; Padgett y Slesinger, 2010). La apertura de dichos canales de potasio inducida por la activación farmacológica de los receptores GABA B (por medio de agonistas como el baclofen), induce una corriente inhibitoria postsináptica lenta en neuronas piramidales del hipocampo (Dutar y Nicoll, 1988), así como en otro tipo de neuronas. El mecanismo por el cual se produce dicha apertura, se debe a los efectos directos de las proteínas Gi/o ($\text{G}_{i/o}$) sobre el canal, y su modulación por segundos mensajeros y enzimas como la fosfolipasa C, proteína quinasa C, proteína quinasa A, proteína fosfatasa 2A y proteínas de señalización (RGS), entre otros (Luján et al., 2009).

Sin embargo, los efectos de la activación de los receptores GABA B sobre los niveles de AMPc son variables, ya que cuando un neurotransmisor (p. Ej. norepinefrina) activa la adenilato ciclasa y por lo tanto se incrementan los niveles de AMPc, la activación de los receptores GABA B incrementa mucho más dichos niveles (Karbon et al., 1984). Estos efectos duales del receptor GABA B sobre los niveles de AMPc, pueden ser explicados por la variedad en los subtipos de proteínas G activados, así como sus efectos sobre la adenilato ciclasa (Bettler et al., 2004).

Por último, como se mencionó anteriormente, la activación de los receptores GABA B inhiben la corriente mediada a través de canales de calcio voltaje dependientes. Este efecto depende de la activación de proteínas G y es explicado por cambios en la cinética del canal con respecto al voltaje de la membrana (Mintz y Bean, 1993). Estos efectos, pueden tener implicaciones importantes en cuanto a la actividad sináptica.

1.2.1.2. Distribución de los Receptores GABA B en el Hipocampo

Mediante métodos bioquímicos, morfológicos y electrofisiológicos se ha podido identificar que las subunidades para los receptores GABA B, poseen propiedades y distribuciones diferentes. Las subunidades denominadas como GABA B (B1a/b) y (B2) (en otra denominación R1 y R2), son expresados de forma diferencial en las células principales (neuronas piramidales y granulares) de la formación hipocampal (Pinard et al., 2010; Kulik et al., 2003). Ambos tipos de receptores son expresados en las zonas correspondientes al árbol dendrítico (en el SLM) de ambos tipos de neuronas principales. Las subunidades GABA B R1b se expresan principalmente en las dendritas distales de las neuronas piramidales y los receptores GABA B R1a se expresan principalmente en los somas. Así mismo, el receptor GABA B (B1a/b), se expresa en el soma de las células piramidales de CA1 y en interneuronas. Ambas subunidades se expresan a nivel presináptico (en terminales glutamatérgicas y gabaérgicas) y a nivel post sináptico; sin embargo los receptores GABA B se expresan principalmente a nivel extrasináptico. Prueba de ello es la necesidad de estimular varias células GABAérgicas para poder liberar suficiente GABA a nivel extracelular (spillover) y activar dichos receptores (Kulik et al., 2003; Scanziani, 2000). Los receptores GABA B se expresan en gran medida en las neuronas piramidales de CA1 y CA3 asociados a las terminales glutamatérgicas antes que a las gabaérgicas (Kulik et al., 2003). Los anteriores estudios contrastan con un reciente trabajo, en donde los receptores GABA B R1 fueron detectados en las dendritas de las neuronas piramidales de CA3, mientras que los receptores GABA B R2 se detectaron en el SLM y stratum radiatum pero no en las neuronas piramidales (Meir, 2010). Sin embargo las diferencias en cuanto a las técnicas empleadas pueden explicar estas disparidades.

Finalmente, la distribución de las subunidades del receptor GABA B en el hipocampo se modifica a lo largo del desarrollo. En este sentido, la expresión diferencial de las subunidades no solo varía en las neuronas piramidales, si no que involucra las interneuronas y las células gliales; estas últimas expresan principalmente la subunidad B1a/b (López-Bendito et al., 2004).

1.2.1.3. Función sobre la Actividad Neuronal y la Transmisión Sináptica

El receptor GABA B tiene efectos tanto presinápticos como post sinápticos. Los estudios farmacológicos clásicos ya indicaban la heterogeneidad de las respuestas obtenidas mediante la activación de los receptores GABA B. Gracias al desarrollo de

fármacos agonistas y antagonistas específicos se han podido caracterizar estos efectos sinápticos (Misgeld et al., 1995; Raiteri et al., 1992).

Anteriormente se mencionó que en el hipocampo, hay evidencia de la expresión de los receptores GABA B en terminales glutamatérgicas y gabaérgicas (Kulik et al., 2003). La activación de los receptores GABA B presinápticos inhiben la liberación de GABA y glutamato, así como de otros neurotransmisores (noradrenalina y acetilcolina) en el sistema nervioso (Taniyama et al., 1992; Taniyama et al., 1993; Misgeld et al., 1995; Bowery et al., 2002;). Hay varios mecanismos de acción que explican tales efectos presinápticos. En primer lugar, hay evidencia de que las proteínas G inhiben directamente los canales de Calcio voltaje dependientes (subfamilia CaV2), los cuales son necesarios para la liberación de los neurotransmisores (Dolphin, 2003). Igualmente, la activación de los receptores GABA B inhiben la corriente presináptica tipo N y P/Q (Bowery et al., 2002). Adicionalmente, se ha planteado que los receptores GABA B reducen la liberación de glutamato por medio de los canales de calcio tipo P/Q, efecto que es revertido por la administración de tertiapin-Q, un antagonista de los canales de potasio tipo GIRK, lo cual indica una interacción entre ambos canales (Ladera et al., 2008). Por último, dado que la activación de los receptores GABA B implica la activación de las proteínas G, es posible que muchos efectos presinápticos sean igualmente explicados por los efectos sobre segundos mensajeros y enzimas intracelulares (Harish y Role, 1992; Taniyama et al., 1992; Raiteri, 2008).

Los receptores GABA B activan múltiples sistemas de señalización intracelular, sin embargo uno de sus efectos postsinápticos principales consiste en incrementar la conductancia para el potasio a través de los canales GIRK. La apertura de dichos canales produce una salida de potasio y por lo tanto una corriente inhibitoria postsináptica (Misgeld et al., 1995; Luján et al., 2009). Dado que los efectos del receptor GABA B sobre los canales GIRK dependen de proteínas G y segundos mensajeros, la hiperpolarización postsináptica inducida por GABA B tiene una cinética lenta (mayor latencia y duración) en comparación con la hiperpolarización inducida por el receptor GABA A (Mott y Lewis, 1992). De esta manera, los receptores GABA B reducen la respuesta excitatoria postsináptica principalmente a través de la hiperpolarización de la membrana. Este mecanismo es diferente al de los receptores GABA A, en el que estos efectos dependen además del incremento de la conductancia de la membrana (Malouf et al., 1990; Misgeld et al., 1995).

En cuanto a los efectos a largo plazo, los receptores GABA B además de activar múltiples sistemas de señalización intracelular, pueden afectar directamente la actividad de factores de transcripción y así modular la expresión de genes y factores tróficos de la célula (White et al., 2000; Nehring et al., 2000). Además de estos efectos, hay evidencia de la participación del receptor GABA B en la LTD (Long Term Depression) y LTP en el hipocampo, procesos que han sido relacionados con los procesos de aprendizaje y memoria (Mott y Lewis, 1992; Nishiyama et al., 2010). Finalmente, hay evidencia de que los receptores GABA B tienen un papel importante en la actividad oscilatoria de las neuronas. Dicha actividad oscilatoria afecta la función global del hipocampo, y se cree que está relacionado con la actividad cognitiva (Sanzani, 2000; Nishiyama et al., 2010).

1.3. CANALES DE POTASIO

1.3.1. Tipos de Canales de Potasio

Existen cuatro grandes grupos de canales de potasio descritos en el sistema nervioso.

En primer lugar se encuentran los canales de potasio activados por calcio. Este tipo de canales son activados por el incremento en los niveles de calcio intracelular. Una vez activados generan una hiperpolarización de la membrana. Se han catalogado dos tipos de canales de K^+ activados por Ca^{2+} : los denominados BK (Maxi-K), los cuales tienen una alta conductancia al potasio y los SK (Small - K), los cuales presentan una menor conductancia (Reinhart et al., 1989; Hammond, 1997).

En otra categoría se encuentran los canales de potasio rectificadores de entrada. Este tipo de canales se caracterizan por generar un flujo de corriente hacia el interior más fácilmente que hacia el exterior de la célula. Existen cuatro subfamilias pertenecientes a este grupo: IRK (Classical Inwardly Rectifying K^+), GIRK (G protein-coupled inwardly rectifying K^+), subfamilia KIR dependiente de ATP (ATP-dependent K^+ channels) y KIR sensible a ATP (ATP-sensitive K^+ channels) (Isomoto et al., 1997).

Los canales de potasio de dominio poro en tándem (tandem pore domain potassium channel). Se caracterizan por generar lo que se conoce como corriente de pérdida (leak current) y por generar corrientes rectificadoras de entrada. En tal caso algunos autores la incluyen dentro de la anterior categoría (Isomoto et al., 1997) y otros, por sus características estructurales la incluyen en una categoría diferente. Es uno de los tipos de canales más numerosos en las células (Rang et al., 2003; Enyedi y Czirják, 2010).

Por último, se encuentran los canales de potasio voltaje dependientes, los cuales se caracterizan por su sensibilidad a los cambios de voltaje de la membrana. Estos canales forman la mayor y más diversa familia de canales de potasio, con canales denominados como Kv desde el 1.1 hasta el 12.3. Muchos de estos canales son rectificadores retardados, rectificadores de salida y entrada, de activación lenta, entre otros (Gutman et al., 2005; Rang et al., 2003).

1.3.2. Efectos de los Canales de Potasio sobre la Actividad Neuronal

Dada su alta conductancia en reposo y sus efectos sobre el potencial de membrana y potencial de acción, los canales de potasio tienen un papel destacado sobre la excitabilidad de las neuronas. Cada uno de estos efectos depende de las propiedades de cada tipo de canal.

Los potenciales de acción registrados en las dendritas y soma de neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo están asociados al incremento en la conductancia de calcio. Dicho incremento en los niveles de calcio intracelular abren los canales de potasio activados por calcio ($I_{K(CA)}$) y los canales rectificadores retardados (I_K) los cuales median la repolarización (Poolos y Johnston, 1999; Hammond, 1997). A sí mismo, el fenómeno de adaptación de los potenciales de acción tras un estímulo despolarizante, depende de la corriente hiperpolarizante mediada por canales de potasio activados por calcio: I_{AHP} (afterhyperpolarization-AHP) (Charpak et al., 1990; Hammond, 1997). De esta manera, estos canales regulan la actividad excitatoria de la célula.

Los canales rectificadores de entrada, tiene un rol principal en el mantenimiento del potencial de membrana, la duración del potencial de acción, inhibición dependiente de receptor de la excitabilidad neuronal, y finalmente de la secreción y recaptación de iones de K^+ . La cinética de estos canales no solo dependen del potencial de membrana, si no que dependen del potencial de equilibrio para el potasio (Isomoto et al., 1997).

Por otro lado, los canales de potasio de dominio poro en tándem contribuyen a estabilizar el potencial de membrana de la célula, así como regular la despolarización y controlar el patrón de potenciales de acción. Sus efectos reguladores dependen de factores como el PH, la temperatura y factores mecánicos, entre otros agentes biofísicos, además de diversas vías de señalización intracelular (Enyedi y Czirják, 2010).

Los canales de potasio voltaje dependientes, tienen múltiples funciones, y como se dijo anteriormente, son uno de los tipos de canales con mayor variedad. Entre las funciones

fisiológicas atribuidas a este tipo de canales se encuentra el mantenimiento del potencial de reposo, la modulación de la excitabilidad neuronal, regular la duración del potencial de acción y la frecuencia de disparo, regulación de la actividad presináptica e incluso algunos subtipos de canales voltaje dependientes no tienen una función conocida (Gutman et al., 2005). Los dos grandes grupos de canales de potasio voltaje dependientes (rectificadores retardados y canales tipo -A), tienen un papel importante en la repolarización del potencial de acción y en retardar el inicio del mismo (Hammond, 1997).

1.3.3. Corrientes de Potasio en las Neuronas del Hipocampo

Estudios clásicos en neuronas piramidales de la región CA1 y CA3 han mostrado como interactúan y coexisten los diferentes tipos de corrientes de potasio para regular la actividad neuronal. Existen 4 tipos de corrientes principales dependientes de voltaje: I A, ID, IK e IM con diferentes roles en la excitabilidad neuronal. El papel fisiológico de la corriente tipo IA es retardar el inicio del potencial de acción previa hiperpolarización y regular los patrones de disparo repetitivos (Storm et al., 1990; Hammond, 1997). La corriente tipo ID, retarda mucho más el inicio de los potenciales de acción y además participa en la repolarización junto con la corriente IK (Storm, 1988; Storm et al., 1990). La corriente IM se diferencia de las anteriores en que no se inactiva con la despolarización sostenida. Su rol fisiológico consiste en atenuar las entradas excitatorias, reducir el número de potenciales de acción frente a una corriente despolarizante (adaptación) y contribuye con la posthiperpolarización media (mAHP). Su denominación se debe a su inhibición por muscarina (Brown y Constanti, 1980; Storm et al., 1990). Además de las anteriores, en el hipocampo se destacan las corrientes tipo IC y IAHP dependientes de calcio. La tipo IC igualmente depende de voltaje. La corriente tipo IC participa en la repolarización y en la AHP rápida (fAHP) y media, así como en la adaptación. Finalmente la IAHP participa en el fenómeno de adaptación y en la AHP lenta (sAHP) (Storm et al., 1990).

Además de los efectos de las diferentes corrientes de potasio sobre la actividad intrínseca de la célula, se ha señalado que igualmente tiene implicaciones sobre la eficacia sináptica y la plasticidad de las células piramidales del hipocampo (Lancaster et al., 2001). En este sentido, el bloqueo en la expresión de canales de potasio voltaje dependientes, afecta la inducción de la LTP en la región CA1 del hipocampo (Meiri et al., 1998).

1.3.4. Canales de Potasio acoplados a proteínas Gs

Dentro de los canales de potasio rectificadores de entrada, se encuentra un subtipo que depende de la activación de receptores de membrana acoplados a proteínas G. Dichos canales como se mencionó anteriormente son los efectores de la respuesta hiperpolarizante tras la activación de los receptores GABA B y son denominados como canales de potasio tipo GIRK (G protein-coupled inwardly rectifying K⁺). Estos canales son activados igualmente por otros receptores: receptores muscarínicos M2, α_2 adrenérgicos, D2 dopaminérgicos, opioides (μ , κ y δ) y de adenosina A1 (Ikeda et al., 1995; Dascal, 1997; Kobayashi et al., 1999) sin que en la actualidad se reconozca una afinidad especial por cada uno de estos receptores.

En cuanto a sus características estructurales, el canal GIRK esta formado por dos dominios transmembrana (M1 y M2) y un bucle formador de poro (formado por 4 subunidades). A nivel intracelular, presenta un grupo amino y otro carboxilo terminal los cuales interactúan con las subunidades G α y G $\beta\gamma$ de las proteínas G que se encargan de la apertura del canal (Lujan et al., 2009). Han sido clonados en mamíferos 4 subunidades para los receptores GIRK (1-4) y una quinta subunidad GIRK 5 ha sido clonada en *Xenopus*, cada una con distribución variable en el encéfalo. La subunidad GIRK 3 es la más abundante en el cerebro, mientras que la GIRK 4 tiene una escasa expresión. La subunidad GIRK 4, se expresa principalmente en hipocampo y colículo superior mientras que GIRK 1, 2 y 3 se expresan principalmente en hipocampo, neocórtex, sistema olfatorio, diencéfalo, ganglios basales y múltiples núcleos del tallo cerebral, entre otros (Dascal, 1997). Los canales GIRK en el hipocampo se expresan principalmente a nivel post sináptico, específicamente en las dendritas de células piramidales (Drake et al., 1997; Chen y Johnston, 2005), usualmente co expresados con los receptores GABA B a nivel extrasináptico. Las subunidades GIRK 1 y 3 tienen una distribución extrasináptica, mientras la subunidad GIRK 2 se expresa a nivel sináptico (Lujan et al., 2009).

En cuanto a sus propiedades fisiológicas, los canales GIRK presentan una conductancia unitaria de 33 pS y son los efectores de la hiperpolarización de cinética lenta inducida por la activación de los receptores GABA B. La respuesta inhibitoria postsináptica es registrada incluso en condiciones de reposo y es capaz de atenuar la propagación de las entradas excitatorias sinápticas en las neuronas piramidales del hipocampo (Drake et al., 1997; Chen y Johnston, 2005). Los canales GIRK participan en diversas formas de

plasticidad sináptica excitatoria mediada por receptores NMDA, tales como en la depotenciación de la LTP en neuronas del hipocampo (Chung et al., 2009).

1.4. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

1.4.1. Introducción

La enfermedad de Alzheimer (EA), fue descrita inicialmente por Alois Alzheimer en 1911 como un desorden neuropsiquiátrico que afectaba a la población mayor. La enfermedad fue descrita por primera vez en una mujer de aproximadamente 50 años de edad, la cual presentó como cuadro clínico cambios del comportamiento, paranoia y alteraciones en la memoria. Antes de conocerse los hallazgos patológicos característicos de la enfermedad, este primer caso fue descrito inicialmente como un caso de demencia presenil. Luego del fallecimiento de la paciente su cerebro fue ampliamente estudiado (Vishal et al., 2011). Sus estudios patológicos iniciales por medio de tinciones de plata, mostraban múltiples lesiones en la corteza cerebral, los cuales se correspondían con los ovillos neurofibrilares. En los años 30s, el uso de colorantes como Rojo Congo permitió identificar las placas seniles. Fue hasta los años 80s en los que se identificó que los depósitos de amiloide correspondían a agregados del péptido beta amiloide y que los ovillos neurofibrilares estaban compuestos por la proteína tau fosforilada (Maccioni et al., 2001). Los hallazgos patológicos característicos de la enfermedad de Alzheimer, permitió catalogarla y diferenciarla de otros tipos diferentes de demencias y además ha permitido establecer criterios diagnósticos específicos, así como marcadores biológicos .

1.4.2. Epidemiología

Se considera que la prevalencia mundial de pacientes con demencia esta alrededor de los 24 a 27 millones de personas; cifras que pueden duplicarse al cabo de 20 años y que generan grandes costos sociales (Reitz et al., 2011; Wimo et al., 2005). La enfermedad de Alzheimer es el tipo de demencia más frecuente, el cual según estadísticas de U.S, puede afectar entre un 5 a 10% de las personas mayores de 65 años (Purves et al., 2001). Igualmente en España, la prevalencia esta alrededor de 4 a 11% para sujetos mayores de 65 años (Criado-Alvarez y Romo Barrientos, 2010). Solo en U.S existen 5 millones de personas con diagnostico de E. Alzheimer y 400 mil en Reino Unido. Así mismo, la prevalencia de la enfermedad se incrementa con la edad: 1 en doscientas personas mayores de 60 años; personas mayores de 80 tienen una prevalencia del 20% y en individuos mayores de 90 años es del 50% (Andersen et al., 2007). Por lo tanto a

medida que se incrementa la expectativa de vida, los índices de enfermedad de Alzheimer serán cada vez mayores. La mayoría de los casos de la demencia tipo Alzheimer corresponde con la forma esporádica de la enfermedad. Solo entre el 5 a 10% de los pacientes que presentan esta patología tienen un tipo de la enfermedad denominada como Alzheimer familiar, la cual tienen un modo de transmisión autosómico (Selkoe, 2001).

1.4.3. Características Clínicas

La enfermedad de Alzheimer (EA) se caracteriza desde el punto de vista clínico por una serie de alteraciones cognitivas que incluyen trastornos del lenguaje (disnomia y afasia), de la percepción y orientación, siempre acompañados por alteraciones en la memoria. Igualmente, en sus fases iniciales, estos hallazgos no se acompañan de trastornos motores, sensitivos o de la coordinación (McKhann et al., 1984). Otros trastornos incluyen apraxia (deterioro en la ejecución de actividades motoras, sin déficit en la función motora), agnosia (déficit en la identificación de objetos) y alteración en la función ejecutiva (planificación, secuenciación y abstracción) (De la vega y Zambrano, 2011).

Las alteraciones de la memoria son uno de los hallazgos principales que se hacen evidentes incluso en las fases más tempranas de la enfermedad. El déficit en la memoria es mucho mayor para eventos recientes antes que en la memoria de largo plazo. Hay igualmente diferencias en cuanto a las fases de la memoria afectadas, siendo mayor para la fase de recuperación (o recuerdo) antes que en la adquisición (Swanberg y Cummings, 2003). Así mismo, los pacientes con EA presentan un deterioro en la memoria para eventos autobiográficos, nombres y rostros familiares y finalmente a nivel espacial (De Leo et al., 2011; Andersen et al., 2007). Uno de los tipos de memoria más afectados en la enfermedad del Alzheimer es la memoria episódica, que como se dijo anteriormente afecta la recuperación de información relacionada con eventos recientes. La memoria episódica es dependiente de la actividad del hipocampo; en un estudio reciente, los déficits en memoria episódica vistos en la EA se han asociado a alteraciones estructurales del hipocampo y adicionalmente al depósito del péptido beta amiloide (Chételat et al., 2011).

Además de los hallazgos clínicos, en fases avanzadas de la enfermedad se han descrito síntomas neuropsiquiátricos, que incluyen cambios de personalidad, delusiones, alucinaciones, depresión, estados de agitación psicomotora, además trastornos del

movimiento como parkinsonismo ya en estadios muy avanzados (Swanberg y Cummings, 2003; De la vega y Zambrano, 2011).

1.4.4. Déficit Cognitivo Leve

El déficit o deterioro cognitivo leve hace referencia a un estado inicial a los procesos de demencia, considerándose un estado previo al desarrollo de la EA. Presenta una prevalencia del 3 al 16.8 % dependiendo de la edad y tiende a incrementarse después de los 65 años (DeCarli, 2003). Se caracteriza clínicamente por un déficit cognitivo superior al que se espera para la edad y nivel educativo del paciente, con deterioro principalmente de la memoria sin alteraciones significativas en otras funciones cognoscitivas (Sánchez-Rodríguez y Torrellas-Morales, 2011). Dependiendo de los criterios diagnósticos y de la población estudiada, entre un 12 a un 23 % de los pacientes con déficit cognitivo leve progresan a EA (Maioli et al., 2007; Iniguez, 2006). La etiología de este déficit es variable (vascular, farmacológica, por depresión, entre otras, aunque la mayoría es idiopática), sin embargo estudios neuropatológicos indican hallazgos insipientes de la EA (p. Ej. ovillos neurofibrilares), así como enfermedad cerebrovascular en los pacientes con predominio de deterioro mnésico (DeCarli, 2003). Estudios recientes indican una relación entre el depósito de beta amiloide y la disfunción sináptica en pacientes con déficit cognitivo leve, los cuales presentan un alto riesgo de EA. La disfunción sináptica puede incluir efectos presinápticos y postsinápticos, múltiples sistemas de neurotransmisión y finalmente afectar la plasticidad sináptica de estructuras que participan en el procesamiento de la memoria (Selkoe, 2008; Potter et al., 2011; Tosun et al., 2011).

1.4.5. Fisiopatología

Dentro de los hallazgos patológicos descritos en estudios postmortem de pacientes diagnosticados con enfermedad de Alzheimer, se destacan: a nivel extracelular, la acumulación del péptido B amiloide en forma de placas; a nivel intracelular, ovillos neurofibrilares y finalmente, pérdida neuronal selectiva y atrofia cerebral en zonas específicas (Maccioni et al., 2001; Goedert y Spillantini, 2006).

Mutaciones en el gen que codifica para la Proteína Precursora del Amiloide (APP) así como en la enzima que participa en su procesamiento (presenilina 1) han sido descritas en pacientes que sufren una forma de Alzheimer de inicio temprano (Goate et al., 1991; Sherrington et al., 1995). Otra enzima encargada de la fragmentación de APP,

denominada γ -secretasa ha sido también implicada con la producción de $\text{A}\beta$ (A) en un modelo de estrés oxidativo “*in vitro*” (Shen et al., 2008). Por lo tanto, una alteración en las vías de procesamiento de APP resulta en un incremento en la producción de $\text{A}\beta$ y/o en su agregación en forma de placas. Los efectos tóxicos del $\text{A}\beta$ sobre la función neuronal y el desarrollo de la E. de Alzheimer serán abordados en la sección 1.4.5.1.

Como anteriormente se mencionó, uno de los hallazgos característicos de la E. de Alzheimer es la presencia de ovillos neurofibrilares depositados en el interior de las neuronas. En los años 80s, se descubrió que estos ovillos se encuentran formados por la proteína Tau asociada a los microtúbulos (Kosik et al., 1986). Esta proteína se encuentra en forma hiperfosforilada, formando una red de filamentos compactos. La proteína Tau es importante para el ensamblaje y estabilización de los microtúbulos, modulando finalmente la estabilidad del cito esqueleto y la morfología axonal. Aparentemente esta hiperfosforilación se encuentra asociada a un incremento en la actividad de diferentes kinasas (cdk5, GSK3B) inducida a su vez por las formas fibrilares de $\text{A}\beta$ (Alvarez et al., 1999). Los ovillos neurofibrilares se depositan principalmente en estructuras como hipocampo, corteza entorrinal y amígdala (Maccioni et al., 2001), estructuras importantes para el procesamiento de la memoria.

La desregulación en la actividad de las kinasas y por lo tanto en el nivel de fosforilación de la proteína Tau, afecta la dinámica del citoesqueleto produciendo alteraciones en la función celular. Estos procesos a su vez se han visto relacionados con los procesos de neurodegeneración (Maccioni et al., 2001; Mandelkow et al., 1995). Por otro lado, la neurodegeneración se ha visto muy relacionada con el depósito de formas tóxicas de $\text{A}\beta$ (Bezprozvanny y Mattson, 2008). Además de los anteriores factores, hay evidencia de un incremento en el estrés oxidativo en cerebros de sujetos con E. de Alzheimer, resultado de un incremento en los radicales libres (Markesbery, 1997), así como una alteración en las enzimas antioxidantes. Esto trae como resultado un incremento en la oxidación de proteínas, lípidos y ADN, y por consiguiente degeneración neuronal (Varadarajan et al., 2000).

El proceso de neurodegeneración en la E. de Alzheimer, no se da en todo el cerebro sino que es mas bien un proceso selectivo que afecta a ciertos circuitos, sistemas de neurotransmisión y estructuras cerebrales. Uno de los sistemas de neurotransmisión típicamente afectados en la enfermedad de Alzheimer es el sistema colinérgico. Múltiples estudios muestran una alteración en la actividad colinérgica a nivel cortical

(Coyle et al., 1983; Wevers et al., 2000) y a nivel del hipocampo (Maki et al., 2002); así como en el sistema colinérgico septo hipocampal (Abe et al., 1994). Otras evidencias de los efectos selectivos vistos en la EA son los estudios de imágenes funcionales. Los sujetos con E. de Alzheimer muestran una menor actividad metabólica así como hipoperfusión en áreas como el lóbulo temporal medial (Wang et al., 2009a), giro cingulado posterior, corteza de asociación parietal y giro frontal medio y superior (Johnson et al., 2005). En la mayoría de casos, independiente del estudio realizado se señala además una atrofia cortical importante.

1.4.5.1. Hipótesis Amiloidea de la EA

Cuando los depósitos del péptido Beta Amiloide fueron identificados como el principal componente de las placas de seniles vistas en la EA y además, cuando se reportaron casos familiares de la EA asociados con alteraciones en el metabolismo de este péptido, se llevó a postular que el péptido A era uno de los causantes de la EA. Recientes investigaciones indican que los efectos del A pueden darse incluso antes del depósito en placas, y por lo tanto grandes esfuerzos se han llevado a cabo en estudiar los efectos de las formas solubles del péptido A (Nimmrich y Ebert, 2009; Maccioni et al., 2001). Hoy en día es claro, que el depósito de Amiloide es uno de los procesos que disparan los eventos moleculares y celulares que llevan al desarrollo de la E. de Alzheimer (Fig. 3). Esta afirmación se basa en el hecho de que los depósitos de A en forma de placas seniles, se encuentra en proximidad con neuronas en degeneración (Katzman y Saitoh, 1991) y en la demostración de los efectos tóxicos del A sobre neuronas en cultivo (Varadarajan et al., 2000). Se han reportado otros eventos asociados con la E. de Alzheimer que son generados por el péptido A:

A induce Fosforilización de Tau: como anteriormente se mencionó, uno de los hallazgos característicos de la E. de Alzheimer es la presencia de los ovillos neurofibrilares. Hay evidencia de que la agregación de la proteína Tau puede ser inducida por el péptido A, proceso que a su vez podría estar mediado por la proteína cdk5, entre otras kinasas (Maccioni et al., 2001).

A y Estrés Oxidativo: hay evidencia de un incremento del estrés oxidativo en cerebros de pacientes con E. Alzheimer. Según recientes hallazgos, los depósitos del péptido A (Butterfield y Bush, 2004), puede aumentar los niveles de radicales libres y por lo tanto, inducir oxidación de proteínas, peroxidación de lípidos y formación de especies

reactivas de oxígeno, los cuales afectan la función neuronal, aumentando los niveles de calcio intracelulares y finalmente produciendo muerte celular (Varadarajan *et al.*, 2000).

A afecta la membrana plasmática: El péptido A puede interactuar directamente sobre los lípidos (Matsuzaki, 2007) y proteínas (Sultana y Butterfield, 2008) de la membrana. Por otro lado el aumento de radicales libres inducidos a su vez por el péptido A, afectan los lípidos y las proteínas de la membrana plasmática, lo que explica en parte el aumento en la permeabilidad en las neuronas (Varadarajan *et al.*, 2000). Sin embargo, se ha descrito que el A puede formar directamente canales catiónicos en las membranas lipídicas (Pollard *et al.*, 1993) y de esta manera producir neurotoxicidad.

BA induce disfunción mitocondrial: Además de los efectos del A sobre la membrana plasmática, se ha descrito recientemente que este péptido puede afectar la función mitocondrial. El péptido A es capaz de producir poros de permeabilidad mitocondrial, el cual a su turno afecta el gradiente de protones entre la membrana interna y la matriz, además induce la liberación del citocromo c al citoplasma. Esto trae como consecuencia la activación de la apoptosis y alteración en la producción de ATP (Kluck *et al.*, 1997).

1.4.5.2. Péptido Beta Amiloide y Disfunción Sináptica

Además de los factores que inducen degeneración celular, se ha descrito que el péptido

A puede afectar el procesamiento cognitivo y los procesos de memoria, antes de que se produzcan lesiones cerebrales evidentes. Estos efectos se deben a que el A afecta la función sináptica en estructuras cerebrales que participan en el procesamiento de la información (Marcello *et al.*, 2008). Incluso, antes del depósito en forma de placas, las formas solubles y oligoméricas del A afectan la función sináptica en estructuras como el hipocampo y las cortezas de asociación (Selkoe, 2002). Igualmente, la administración de formas solubles del A puede afectar de forma aguda la función sináptica en neuronas de hipocampo cultivadas. En un estudio previo, el A disminuyó el pull de vesículas sinápticas en terminales nerviosas excitatorias y además disminuyó el número de espinas dendríticas de estas células. Estos hallazgos fueron relacionados con una disminución en las *corrientes posinápticas excitatorias miniatura* (mEPSCs) y por lo tanto con una disminución en la eficacia sináptica (Calabrese *et al.*, 2007). El fenómeno de depresión sináptica, igualmente se ha relacionado con reducción en los niveles de sinaptofisina (proteína asociada a las vesículas presinápticas) en diferentes modelos animales y en estudios clínicos (Mucke *et al.*, 2000; Sze *et al.*, 1997).

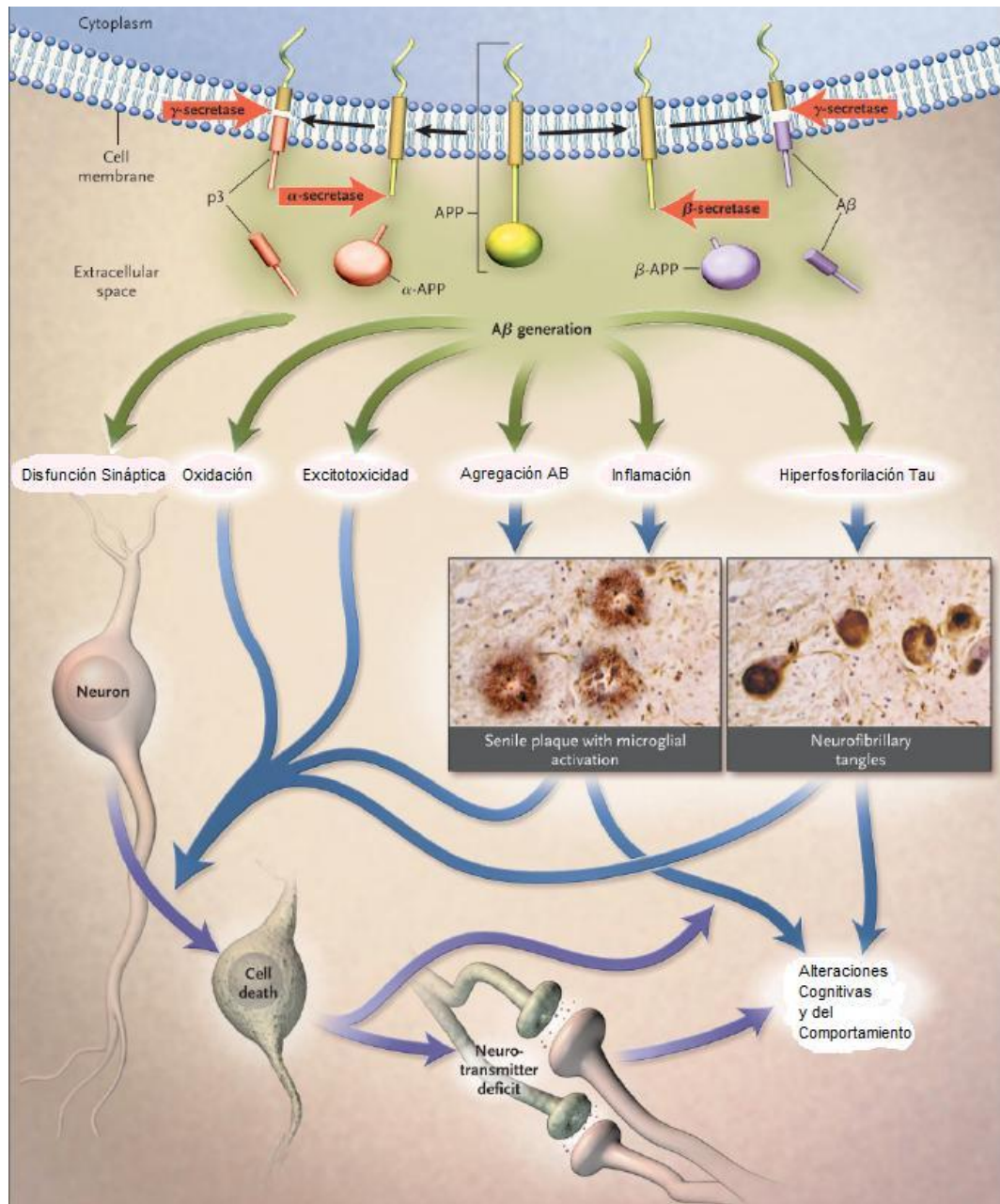


Fig. 3. Representación de la cascada Amiloidea y la fisiopatología de la EA. El A es generado desde el precursor APP, a través de diferentes enzimas y luego de una producción excesiva se generan alteraciones celulares, neurodegeneración y disfunción sináptica la cual explica el déficit cognitivo en la EA (adaptado y modificado de Cummings, 2004) .

Igualmente, los efectos del A sobre diversos sistemas de neurotransmisión han sido ampliamente estudiados. En este sentido, los principales neurotransmisores que se asocian con los síntomas tempranos de la enfermedad incluye el sistema colinérgico y el glutamatérgico (Selkoe, 2002). En cuanto a los efectos glutamatérgicos presinápticos, se

ha descrito tanto exceso en la liberación de glutamato y excitotoxicidad (Butterfield et al., 2007), como depresión de la respuesta glutamatérgica por inhibición de los canales de calcio presinápticos (Ashenafi et al., 2005), esto dependiendo de la concentración y tipo de A (Palop y Mucke, 2010). En cuanto a los efectos glutamatérgicos postsinápticos, hay evidencia de que el péptido A puede afectar los receptores ionotrópicos para glutamato NMDA y AMPA de manera diferencial. El A puede incrementar la conductancia iónica para NMDA (Molnar et al., 2004) y por otro lado disminuir la de AMPA (Parameshwaran et al., 2007). Con respecto al sistema colinérgico, muchas de las vías y circuitos cerebrales colinérgicos están deteriorados en la EA (Abe et al., 1994; Maki et al., 2002), además tanto la síntesis como las vías de procesamiento de la acetilcolina son afectados cuando se incrementan los niveles de A y en la EA propiamente (Davies y Maloney, 1976; Nyakas et al., 2011; Schliebs y Arendt, 2011). Hoy en día gran parte de los tratamientos para la EA involucran fármacos que aumentan los niveles de acetilcolina (inhibidores de la acetilcolinesterasa), y por otro lado, antagonizan los receptores NMDA (Musiał et al., 2007; Galimberti y Scarpini, 2011).

Finalmente se ha descrito que el A afecta otros sistemas de neurotransmisión, como el serotoninérgico, noradrenérgico y gabaérgico, así como la somatostatina y el CRF, aunque se desconoce actualmente las implicaciones de estos neurotransmisores con la fisiopatología de la EA y el déficit cognitivo mínimo (Selkoe, 2002; Klingner et al., 2003). Los efectos del A sobre la función sináptica también parecen depender de la forma de ensamblaje de dicho péptido (fibrilar, no fibrilar, oligomérica) (Ye et al., 2004; Marcello et al., 2008), así como en los efectos mismos del A sobre la excitabilidad neuronal (Yun et al., 2006).

Se ha propuesto recientemente que el fenómeno de disfunción sináptica podría generar un desbalance entre la neurotransmisión excitatoria e inhibitoria (en regiones tales como el hipocampo) y el resultado, va a depender de la distinta vulnerabilidad de las neuronas específicas o de las sinapsis del sistema afectado por el A (Palop et al., 2007; Sun et al., 2009; Palop y Mucke, 2010). Por ejemplo, se ha demostrado que el A provoca una alteración de la neurotransmisión excitatoria que induce patrones aberrantes de actividad en sus circuitos neuronales asociados, lo cual es parcialmente compensado por un incremento en la inhibición sináptica (Palop et al., 2007; Palop y Mucke, 2010). Además, la disfunción inducida por A en interneuronas inhibitorias provoca una desestabilización de las redes neuronales hipocámpales (Palop and Mucke, 2010). Estos

mecanismos subyacerían al estado de disfunción sináptica previo a los déficits neurológicos (Palop et al., 2007; Sun et al., 2009; Palop y Mucke, 2010). Sin embargo, los mecanismos específicos a nivel molecular, sináptico, de circuitos o de sistemas que expliquen consistentemente los déficits neurológicos inducidos por el A β siguen siendo desconocidos.

1.4.6. Efectos del Beta Amiloide sobre la función del hipocampo

Como anteriormente se mencionó, la LTP hace referencia a una forma de plasticidad, en la cual la eficiencia de la transmisión sináptica se incrementa a lo largo del tiempo tras una estimulación de alta frecuencia. La LTP fue descrita inicialmente en el hipocampo, y explica parte de las bases neurobiológicas de la memoria. Hay evidencia de que diferentes formas solubles del péptido A β , entre ellos el A β 1-42 y sus fragmentos A β 25-35 y 31-35, pueden inhibir la inducción de LTP en el hipocampo de roedores (Chen et al., 2000; Freir et al., 2001). Este efecto puede ser dependiente del sistema glutamatérgico, colinérgico y del óxido nítrico (NO), entre otros mecanismos (Chen et al., 2002; Kapaí et al 2010). En otros estudios, ratones transgénicos que sobre expresan la proteína APP y por lo tanto tienen incrementados los niveles de A β , se presenta deterioro en el aprendizaje y memoria (Mucke et al., 2000), así como en la inducción de LTP en giro dentado y en la región CA1 del hipocampo (Chapman et al., 1999). Así como el A β inhibe la LTP al mismo tiempo incrementa la LTD (Long Term Depression) mediante mecanismos glutamatérgicos, colinérgicos y de señalización intracelular (Ondrejčák et al., 2009). Animales transgénicos que producen altos niveles de péptido A β (Kotilinek et al., 2002), así como aquellos a los que se les administra A β de manera exógena, presentan deterioro en diferentes tipos de memoria dependientes del hipocampo. Los efectos de la administración exógena de A β sobre la memoria, puede ser prevenido parcialmente por una disminución de la acumulación de A β y del estrés oxidativo (Kurinami et al., 2008). Estudios de neuroimagen en humanos y roedores muestran que el hipocampo es una estructura muy sensible a los efectos tóxicos del A β . En un reciente estudio se muestra que dentro de la formación hipocampal, la corteza entorrinal presenta disminución en el flujo sanguíneo regional. Estos hallazgos fueron co-relacionados con deterioro en las pruebas de memoria dependientes del hipocampo (Moreno et al., 2007). Con respecto a los mecanismos de la disfunción observada en células del hipocampo, estudios de neuronas de hipocampo cultivadas expuestas a A β ,

muestran los diferentes procesos encargados de la neurodegeneración y la neurotoxicidad. Entre los mecanismos descritos se destacan: el estrés oxidativo, la formación de los ovillos neurofibrilares, la disfunción mitocondrial, la inactivación de la bomba Na/K ATPasa y la activación de moléculas pro-apoptóticas (Varadarajan *et al.*, 2000; Maccioni *et al.*, 2001; Kluck *et al.*, 1997). Como se mencionó en la anterior sección, la disfunción sináptica explica en gran medida los efectos del A sobre el funcionamiento del hipocampo (Maki *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2002; Maccioni *et al.*, 2001).

1.4.6.1. Sistema Septo-Hipocampal y Neurotoxicidad por Beta Amiloide

Como se ha indicado previamente, en la EA, el hipocampo es una de las primeras regiones del cerebro en sufrir daño, así como diferentes alteraciones funcionales y estructurales. De esta manera, los déficits de memoria y la desorientación aparecen entre los primeros síntomas asociados a la EA. El hipocampo constituye un área que se halla directamente implicada en la modulación de procesos de aprendizaje y memoria a través de su interacción con otros centros como el hipotálamo o el tallo cerebral, con los cuales mantiene conexiones recíprocas directas a través de la vía fimbria/fornix (Brito y Brito, 1990; Gerashchenko *et al.*, 2001; Degroot and Treit, 2003 ; García *et al.*, 2008). Además, el hipocampo está recíprocamente conectado por dicha vía con el septum medial y la banda diagonal de Broca (MS-DBB), áreas críticamente implicadas en la generación del ritmo theta, así como en otros procesos fundamentales en el aprendizaje y la memoria (Stewart and Fox, 1990; Bland y Oddie, 2001; Buzsaki, 2002; Lega *et al.*, 2011).

El septum y el hipocampo son dos estructuras densamente interconectadas a través de la fimbria/fornix y se encuentran funcionalmente acoplados (Bland y Colom, 1993), por lo que frecuentemente se habla de sistema septohipocampal (Colom, 2006). Las proyecciones septohipocampales incluyen componentes colinérgicos y gabaérgicos bien conocidos (Lynch *et al.*, 1977; Kohler *et al.*, 1984; Bland y Colom, 1993; Schwegler *et al.*, 1996), así como proyecciones glutamatérgicas recientemente descritas (Sotty *et al.*, 2003; Huh *et al.*, 2010).

Desde el punto de vista electrofisiológico, se ha descrito que el hipocampo recibe proyecciones del MS-DBB de diversa naturaleza. Neuronas colinérgicas inervan neuronas piramidales e interneuronas (Widmer *et al.*, 2006), proyecciones gabaérgicas proyectan sobre interneuronas (Freund y Antal, 1988) y proyecciones glutamatérgicas

contactan con las células piramidales de CA3 (Huh et al., 2010). Por tanto, las neuronas que contiene el MS-DBB modulan las funciones de las estructuras con las que se comunica, incluido el hipocampo. La proyección septohipocampal es una vía de neurotransmisión tanto excitatoria como inhibitoria finamente regulada, por lo que constituye un sistema susceptible de ser afectado por el A (Palop et al., 2007) y cuya alteración podría generar déficits que se ajustan a los síntomas descritos para los primeros estadios de la EA. Por ello, las interacciones septohipocampales resultan críticas en las funciones cognitivas (Degroot y Treit, 2003) y constituye el blanco de estudios con fármacos diseñados para mejorar los procesos de aprendizaje y las disfunciones que emergen con la edad.

El sistema Septo-Hipocampal, incluido el MS-DBB, se encuentran entre las áreas susceptibles de sufrir degeneración durante el curso de la EA. Diversos estudios han mostrado los efectos del A sobre neuronas colinérgicas (Yamaguchi y Kawashima, 2001; Kar et al., 1996; Santos-Torres et al., 2007), glutamatérgicas (Santos-Torres et al., 2007; Colom et al., 2010) y gabaérgicas de esta área, afectando por tanto a las funciones de regiones dependientes de su actividad como es el caso del hipocampo.

Se ha demostrado la implicación de la neurotransmisión colinérgica y gabaérgica en la generación del ritmo theta *in vivo*, en las proyecciones desde el septum medial al hipocampo (MS-DBB) (Simon et al., 2006). La generación del ritmo theta depende de la coordinación en la oscilación septohipocampal, y se ha comprobado que la población de células gabaérgicas septales deja de ser funcional en animales tratados con A (Colom et al., 2010). Por otra parte, recientemente se ha demostrado que la inyección de A en el hipocampo induce deterioro progresivo de tareas conductuales junto con una reducción en la capacidad de disparo de las neuronas gabaérgicas septales responsables de la propagación del ritmo theta en el hipocampo. Estos resultados indican que el A induce una depresión funcional específica de las neuronas de proyección inhibitorias de MS-DBB, dando como resultado un deterioro de las funciones dependientes del sistema septohipocampal (Villette et al., 2010).

1.4.7. Efectos del Beta Amiloide sobre los canales Iónicos

El A modifica considerablemente el balance iónico de las neuronas afectando transportadores, bombas y finalmente canales iónicos (Fig. 4). Existe controversia en cuanto a los efectos del A sobre estos últimos, ya que dependiendo del estudio se han

reportado tanto incremento como reducción en la conductancia iónica de la membrana dependiendo del canal (Fraser et al., 1997; Peña et al., 2006). Por otro lado, cabe resaltar que una gran parte de las investigaciones se han enfocado al estudio de los efectos del A sobre los canales de potasio y calcio, dado su papel relevante en la fisiología y excitabilidad neuronal.

En cuanto a los canales de potasio, se ha indicado que el A pueden inhibir o reducir diversos tipos de corrientes de potasio (I_{KCA} , I_K , I_A , I_D) en neuronas colinérgicas y corticales (Jhamandas et al., 2001; Ye et al., 2003). Por otro lado, se ha descrito igualmente que el APP y el A pueden aumentar la conductancia al potasio y las corrientes tipo I_A e I_K en otro tipo de neuronas (Furukawa et al., 1996; Ramsden et al., 2001; Yu et al., 1998). Los efectos del A pueden ser selectivos, o por el contrario afectar un amplio grupo de canales de potasio (Fraser et al., 1997). Estos efectos variables parecen depender del tipo de A, concentración, condición experimental, tipo de canal y/o tipo celular en estudio (Peña et al., 2006). El A en sus diversos tipos ha demostrado ampliamente incrementar la corriente de Ca^{2+} a través de diferentes canales de calcio voltaje y no voltaje dependientes (Fraser et al., 1997; Rovira et al., 2002; Peña et al., 2006); dichos efectos se asocian a la neurotoxicidad y a la degeneración neuronal. Al igual que con los canales de potasio, estudios previos han descrito un bloqueo de algunos tipos de canales de Ca^{2+} presinápticos inducido por A (Ashenafi et al., 2005). Por otro lado, estudios clásicos reportan que el A puede inducir una apertura no selectiva de canales iónicos y así inducir degeneración neuronal (Furukawa et al., 1994). Finalmente hay evidencia de que el A puede formar directamente canales catiónicos en las membranas plasmáticas (Pollard et al., 1993), así como poros de permeabilidad en mitocondrias (Kluck et al., 1997) y de esta manera producir neurotoxicidad mediada por calcio (Arispe et al., 1994). Dada la variabilidad entre los diferentes estudios, se puede decir que no existe un consenso en cuanto a los efectos del A sobre el balance iónico, lo cual indica que existen muchos factores y variables a tener en cuenta a la hora de interpretar y asimilar resultados.

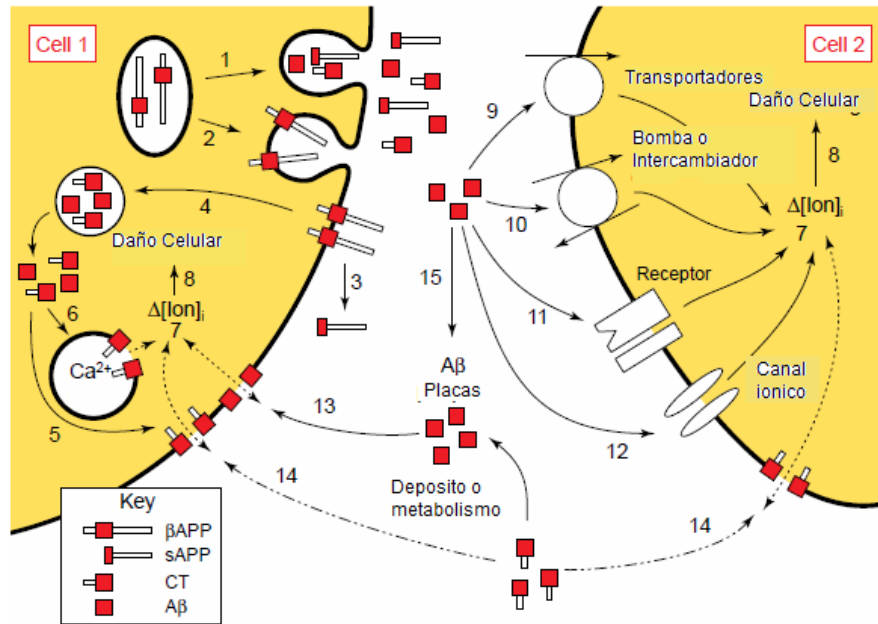


Fig. 4. Efectos del A sobre el balance iónico de las células. En los pasos 1 y 2 se muestra el metabolismo del A desde la proteína APP. En los pasos 4 a 7 y del 13 al 14, se muestra como el A puede formar canales directamente sobre compartimientos intracelulares de Ca^{2+} o sobre la membrana plasmática. Se muestra de 9 a 12 efectos sobre bombas, transportadores, receptores de superficie y finalmente, efectos directos sobre los canales iónicos. CT: fragmento C terminal (Adaptado de Fraser et al., 1997).

1.4.8. Utilidad del Beta Amiloide (25-35) en la investigación Básica de la EA

El Beta amiloide 25-35 es un péptido de 11 aminoácidos que ha sido considerado como la porción o dominio activo de fragmentos mucho más largos encontrados en pacientes con EA, entre ellos el 1-40 y 1-42 (Yankner et al., 1990; Peña et al., 2010). De hecho, el A 25-35 es un subproducto natural del A 1-40, que conserva la toxicidad de su homólogo de cadena larga, así como su capacidad para agregarse en forma de fibrillas (Wei y Shea, 2006). Así mismo, dicho péptido puede ser producido en pacientes con EA a partir del fraccionamiento enzimático del dominio hidrofóbico C-terminal del A 1-40 (Gruden et al., 2004; Peña et al., 2010).

Es de resaltar que el A 25-35 es capaz de generar neurodegeneración, atrofia dendrítica, disfunción sináptica y efectos deletéreos sobre la plasticidad sináptica, de una forma similar como lo hacen los péptidos de cadena larga 1-40 y 1-42 (Yankner et al., 1990; Grace et al., 2002; Freir et al., 2003; Stepanichev et al., 2004). Igualmente, estos efectos se han relacionado con su capacidad para alterar las pruebas de memoria en roedores, así como de interactuar con fármacos empleados para el tratamiento de la EA (Tsunekawa et al., 2008; Cheng et al., 2010; Lu et al., 2011). En un reciente

estudio “*in vitro*” utilizando cultivos organotípicos, se comparó los efectos tóxicos del

A 25-35 y 1-42 en rodajas de hipocampo y se encontraron efectos muy similares sobre el daño neuronal inducido por ambos péptidos (Frozza et al., 2009). Igualmente, muchos de los efectos del A 25-35 sobre la neurotransmisión en el hipocampo son equivalentes con otros fragmentos que son ampliamente utilizados para el estudio de la EA (Kabogo et al., 2010). Muchos de los efectos tóxicos atribuidos al A parecen depender de la metionina en la posición 35 (Clementi y Misiti, 2005), el cual se encuentra en este fragmento corto. Por los motivos anteriormente expuestos y dado sus propiedades de solubilidad (lo cual facilita su aplicación) y finalmente sus efectos rápidos en comparación con formas de A de cadena larga (Varadarajan et al., 2001), el

A 25-35 viene siendo empleado en la actualidad como una herramienta útil para el estudio de la fisiopatología de la EA tanto “*in vivo*” como “*in vitro*”. Finalmente, hay evidencia de que son las formas solubles tempranas de A (formas solubles oligoméricas no plegadas o los pequeños agregados de A que no se depositan inicialmente en los tejidos), antes que las conformaciones fibrilares tardías, las que podrían interferir con el funcionamiento de ciertas redes neuronales y explicar el fenómeno de disfunción sináptica (Shankar et al., 2008; Peña et al., 2010).

2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Como anteriormente se mencionó, una de las teorías más aceptadas en cuanto a la fisiopatología de la EA es la cascada amiloidea. Esta postula que un incremento significativo en los niveles del péptido A induce procesos de neurodegeneración, daño celular y disfunción sináptica en estructuras cerebrales específicas. De hecho, el déficit cognitivo visto en estadios tempranos de la EA es explicado en gran medida por la disfunción sináptica en estructuras que participan en el procesamiento de la memoria como el hipocampo. Sin embargo, a pesar de conocer muchos de los efectos del A sobre la neurotransmisión glutamatérgica y colinérgica, son pocos los estudios realizados sobre los efectos del A 25-35 en la respuesta inhibitoria del hipocampo y la excitabilidad neuronal.

Dado que los efectos agudos del A sobre la sinapsis ocurren antes de que se produzca una lesión cerebral evidente, se considera que es necesario realizar un abordaje más funcional que morfológico para el estudio de dicha disfunción.

El presente trabajo pretende generar nuevos conocimientos en cuanto a los efectos del A 25-35 sobre la neurotransmisión inhibitoria en neuronas del hipocampo mediante un abordaje electrofisiológico. Con esta metodología, se pretende revelar cambios funcionales agudos que explique alguno de los mecanismos del fenómeno de disfunción sináptica.

Dado que la fimbria presenta conexiones inhibitorias tanto directas como indirectas sobre las células de CA3, se decidió estudiar los efectos agudos del A en dicha conexión. Cabe destacar que esta conexión fimbria-CA3 tiene una gran relevancia funcional debido a sus proyecciones asociativo/comisurales que conectan las neuronas piramidales y por su participación en los procesos de memoria y aprendizaje. Además, el sistema septohipocampal (el cual proyecta muchas de sus vías a través de la fimbria hacia el hipocampo) posee estrechas conexiones reciprocas de neuronas glutamatérgicas, colinérgicas y gabaérgicas, y sus interrelaciones influyen de forma directa en los procesos de aprendizaje y memoria, así como en la generación de ritmos cerebrales necesarios para el procesamiento de la información (ritmo theta). Así mismo, esta área se encuentra entre los centros cerebrales especialmente sensibles a sufrir daño durante el curso de la EA por efecto del A.

Por tanto, nuestra hipótesis de trabajo plantea que las formas tóxicas solubles del péptido A afectan al balance entre la neurotransmisión excitatoria e inhibitoria en la sinapsis del sistema septohipocampal fimbria/CA3.

2.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos del péptido Beta Amiloide 25-35 sobre la actividad sináptica septohipocampal fimbria/CA3 y las propiedades biofísicas de las neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar las propiedades electrofisiológicas de las neuronas piramidales de la región CA3.
- Caracterizar la respuesta sináptica en el complejo fimbria -CA3 del hipocampo.
- Evaluar los efectos del péptido Beta Amiloide (25-35) sobre la excitabilidad, resistencia interna y potencial de acción en las células piramidales de CA3.
- Evaluar los efectos del péptido Beta Amiloide (25 -35) sobre la actividad sináptica del complejo fimbria-CA3 del hipocampo.
- Determinar alguno de los posibles mecanismos de acción implicados en el proceso de disfunción sináptica generada por la aplicación del Beta Amiloide (25-35) sobre la actividad del hipocampo.

3. METODOLOGÍA: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Sujetos

Para el presente trabajo, se utilizaron ratas albinas machos y hembras, cepa Wistar, de 27 +/- 4 días posnatal, con pesos comprendidos entre 30 a 40 gramos. Dichos animales fueron suministrados por el bioterio ubicado en el edificio Departamental de la Universidad de Salamanca. Los animales una vez apartados de la camada eran ubicados en una caja de policarbonato y transportados para su sacrificio y registro el mismo día en la Facultad de Medicina.

Los experimentos se realizaron de acuerdo con las normativas españolas para el uso de animales de laboratorio (BOE 67/8509-12. 1988) y de acuerdo a la regulación de la unión europea para este mismo fin.

En este sentido, los animales fueron manipulados de tal manera que se evitó en lo máximo posible producirles sufrimiento, estrés o dolor.

3.1.1. Extracción del Cerebro

Posterior a la anestesia de los animales, los sujetos son decapitados rápidamente y la cabeza es ubicada en una base de plástico rodeada de hielo, la cual mantiene el tejido frío (4 °C aproximadamente) durante la disección, extracción y posterior tallaje del cerebro. En la porción dorsal de la cabeza se realiza un corte sagital en la piel, y se hace una disección hasta exponer el cráneo. Luego se realiza un corte en cruz a nivel occipital y con una pinza-gubia se retira rápidamente el cráneo cuidando de no dañar el cerebro. Una vez se evidencia el encéfalo, se retiran las meninges con una pinza, y con una espátula de pequeño calibre se seccionan los nervios craneales desde la porción anterior hasta la posterior. Luego se corta con unas tijeras el tallo cerebral y se extrae el encéfalo. Durante todo el procedimiento el tejido es bañado con una solución de corte mediante un sistema de macrogoteo a flujo constante. Dicha solución es mantenida con gas carbógeno (O₂: 95%; CO₂: 5%) y a una temperatura fría (2 a 4 °C).

3.1.2. Preparación de la Pieza

Luego de extraerse el encéfalo, se procedió a preparar la pieza de la siguiente manera: en primer lugar, dos cortes coronales, uno a nivel frontal y el otro a nivel del límite cerebelo - región occipital. Finalmente la pieza es separada en dos mitades por medio de un corte sagital (Fig. 5). Una vez separada, la pieza es rápidamente pegada a una base móvil desde su porción dorsal para luego ser cortada en el vibratomo. Durante la preparación, el tejido es bañado por solución de corte mediante el sistema de

macrogoteo previamente descrito. Los cortes son realizados con el mayor cuidado posible para evitar daños mecánicos, así como lesiones que se extiendan al hipocampo.

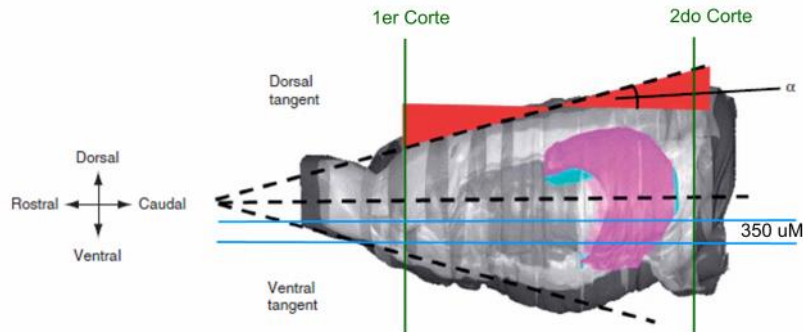


Fig. 5. Preparación de un bloque de cerebro que contiene el hipocampo. Izq. Visión lateral de un cerebro de rata, en donde se encuentra representado en púrpura el hipocampo. Luego de un 1er y 2do corte coronal anterior y posterior (líneas verdes verticales), la pieza es posteriormente cortada en rodajas horizontales (líneas azules) iniciando desde la porción ventral (modificado de Bischofberger et al., 2006).

3.1.3. Extracción de Rodajas

Mediante un microtomo de vibración (Leica VT 100 0S) (Fig. 6) los cortes se realizaron en una cámara con Solución de Corte y gas carbógeno a una temperatura cercana a 0 °C. El tejido previamente extraído y pegado sobre una base fijada al vibratomo es cortado en rodajas de 350 μm de espesor en el plano horizontal. Estudios previos han demostrado que dicho plano mantiene indemne la conectividad de las fibras aferentes a la región CA3 (Schneiderman et al., 1992; Bischofberger et al., 2006). La pieza es sostenida con bloques de agar al 4% dispuestos a nivel anterior, posterior y medial para reducir su movilidad durante el corte. Se emplean cuchillas de cerámica y el corte se realiza desde el borde lateral hasta el medial de la pieza. El vibratomo es programado con los siguientes parámetros de corte:

- Velocidad de avance de la cuchilla: 0,15 mm/ s
- Frecuencia de Oscilación: 70 Hz

Una vez separada la rodaja es movilizada con una pipeta para su incubación. Se obtienen aproximadamente 5 rodajas por cada hemisferio, en los cuales se visualiza la fimbria.



Fig. 6. Vibratomo empleado para la obtención de rodajas del complejo fimbria -CA3 del hipocampo.

3.1.4. Periodo de Incubación

La incubación fue realizada según el protocolo descrito por Bischofberger (Bischofberger et al., 2006). Las rodajas fueron mantenidas inicialmente en Solución de Corte durante 15 a 20 minutos en una placa de petri con gas carbógeno. Luego fue incubada en Solución de Krebs durante un tiempo mínimo de 45 minutos hasta máximo 7 horas. Esta última incubación se realizó en un vaso de precipitado de 80 ml, en cuyo interior se ubica una base de plástico recubierta por una malla de algodón hidrófilo. El burbujeo con gas carbógeno es dispuesto de tal manera que se evita el contacto directo con el tejido, y así evitar el daño mecánico y la movilización de la rodaja. Se disponen 4 o 5 rodajas equidistantes una de otra por cada vaso de precipitado.

3.2. Cámara de Registro

Luego de la incubación cada rodaja es ubicada en una cámara de registro modelo BSC - HT de tipo interfase de gas (Harvard Apparatus Inc.), donde se produce un intercambio rápido y laminar de fluidos, garantizando la estabilidad de la preparación durante el registro (Fig. 7). Las rodajas son dispuestas sobre una malla elástica de nylon, alrededor de la cual fluye la solución de Krebs por acción capilar a temperatura ambiente.

3.3. Sistema de Perfusión

Durante el registro de las rodajas, se utilizó un sistema de perfusión para mantener la viabilidad celular de la preparación. Este sistema de perfusión permite la movilización constante de solución Krebs hacia la cámara de registro de forma laminar. Consiste en

una línea de tubos de plástico flexibles que conectan un reservorio de líquido de 50 ml (vaso de precipitado) a la cámara de registro, recirculando la solución a un rango de 3,5 ml/min. por una bomba de perfusión MiniPuls 3 (Gilson ®).

A.



B.



Fig. 7. A. Cámara de registro tipo Interfase. Corresponde con la Unidad BSC-HT, la cual permite mediante el principio de semi-subinmersión un registro estable de rodajas cerebrales. B. Microscopio Óptico y Cámara de registro. Se evidencia además los micromanipuladores y los electrodos de registro y estimulación.

3.4. Soluciones de Incubación y Registro

Para el registro intracelular de las rodajas de hipocampo se emplearon dos tipos de soluciones: solución de Krebs y solución de Corte. Desde la extracción del encéfalo hasta la obtención de las rodajas, incluido su incubación inicial se utilizó la solución de Corte con una temperatura cercana a 0°C. Para la incubación de largo plazo y el procedimiento de registro se utilizó la solución de Krebs a temperatura ambiente.

	Solución de Krebs (mM)	Solución de Corte (mM)
NaCl	117,00	
KCl	4,70	4,70
CaCl ₂	2,50	2,50
MgCl ₂	1,20	1,20
NaH ₂ PO ₄	1,25	1,25
Glucosa	11,00	11,00
NaHCO ₃	25,00	25,00
Sacarosa		234,00

Tabla 1. Composición de las Soluciones empleadas.

Para mantener la viabilidad de la preparación, la solución de Corte presenta una concentración muy baja de sodio con el fin de reducir la despolarización y la entrada masiva de dicho ión durante la realización de los cortes. El NaCl es sustituido por sacarosa a una concentración de 234 mM con el fin de mantener la osmolaridad de la solución. La solución de Krebs presenta una concentración de iones similar al líquido extracelular en condiciones fisiológicas (Tabla 1).

Cada solución es preparada un día antes del registro y mantenida a una temperatura entre 2 a 4 °C. La osmolaridad de las dos soluciones es de aproximadamente 300 +/- 10 mOsm y su PH es ajustado entre 7,2 a 7,4.

3.2.6. Registro Intracelular- Current Clamp

3.5.1. Electrodo de Registro

Para el registro celular se emplearon como microelectrodos, micropipetas de vidrio de borosilicato rellenos con una solución electrolítica de acetato potásico al 3M. Para la fabricación de las micropipetas se emplearon tubos capilares con un diámetro externo de 1 mm y un diámetro interno de 0,58mm, con filamento interno (WPI). Los tubos son estirados mediante un “Puller” horizontal (estirador de pipetas modelo P87 /Sutter Instrument) (Fig. 8).



Fig. 8. Estirador de pipetas modelo P87, utilizado para hacer las micropipetas /electrodos de registro. Consiste en un estirador horizontal acoplado a una resistencia.

Luego de que la micropipeta toca la preparación se mide la resistencia de la pipeta. Se emplearon solo aquellos electrodos que presentaban una resistencia entre 120 a 180 MΩ. Estos electrodos se conectaron mediante un hilo de plata clorurada a un acoplador de impedancias- Headstage (Bio Logic modelo HS180), con una resistencia de entrada superior a 1×10^{11} Ω y una capacidad de inyección de corriente máxima de 100nA. La

señal fue amplificada (x10) con un amplificador intracelular de tipo Bio Logic modelo VF180 (Fig. 9).

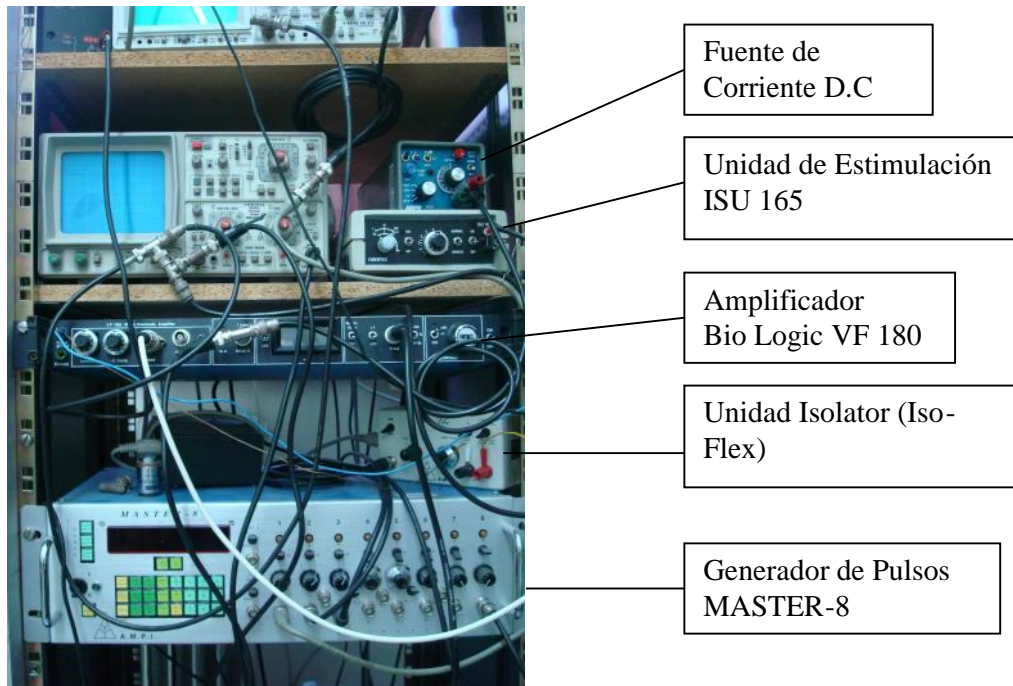


Fig. 9. Disposición de los equipos utilizados para amplificar, acondicionar y visualizar la señal. Se utilizó igualmente un programador de estímulos acoplado a dos unidades de estimulación para el electrodo de registro y el estimulador de la fimbria.

Las señales registradas fueron preamplificadas y leídas en tiempo real a través de un osciloscopio Tektronix modelo 5110. Mediante la técnica de fijación de corriente (configuración Current-Clamp) se mantiene constante la corriente mientras se registra los cambios en el voltaje de la membrana. A través del electrodo se puede inyectar corriente directa, y además aplicar pulsos despolarizantes para caracterizar el patrón de disparo de la neurona. Mediante pulsos hiperpolarizantes de 300ms y hasta 130 pA de amplitud es posible calcular la resistencia de entrada de la célula.

3.5.2. Electrodo Externo de Estimulación

Para provocar las respuestas sinápticas en las neuronas piramidales de CA3 se utilizó un electrodo monopolar de acero inoxidable (WPI), con diámetro de punta de 1 μm y resistencia de 2 M Ω . El estímulo era un pulso con una amplitud entre 100 a 600 μA y 100 μs de duración. La frecuencia y secuencia de pulsos eran programadas por medio de un estimulador modelo MASTER-8 de A.M.P (Instruments LTD), el cual estaba conectado a una unidad Isolator modelo Iso-Flex (A.M.P.I). (Fig. 9)

3.5.3. Microscopio y Micromanipuladores

Para la visualización de la preparación se empleó un microscopio óptico Axioskop de Zeiss encerrado en una caja de Faraday para mantener la preparación y los cables aislados del ruido eléctrico del ambiente.

Mediante micromanipuladores de precisión Narishige (*Axon Instruments*) se posicionó el electrodo de registro y el de estimulación externa sobre la rodaja (Fig. 7).

3.5.4. Localización de Electrodo y Técnica de registro a Ciegas

Una vez visualizado y localizado el hipocampo, el electrodo de registro se ubica en la capa piramidal (stratum pyramidale) de la región CA3 y el electrodo de estimulación externo se ubica sobre la fimbria ipsilateral a 2mm del stratum oriens (Fig. 10).

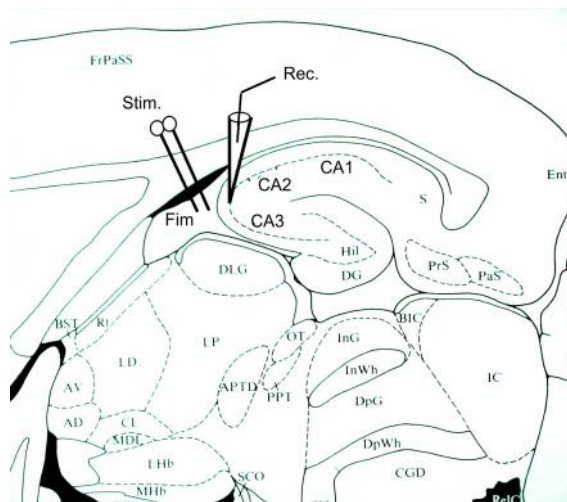


Fig. 10. Ubicación del electrodo de estimulación (Stim.) sobre la fimbria ipsilateral. Electrodo de registro (Rec.) ubicado en el stratum pyramidale de la región CA3 del hipocampo.

Una vez situados ambos electrodos, y luego de verificar la resistencia del electrodo de registro, se procedió a desplazar el mismo en dirección al tejido. Inicialmente, a través del electrodo de registro se aplicaron pulsos despolarizantes de corriente de 0,1nA y 30 ms a una frecuencia de 0,5Hz y cuando se observaba un cambio en el voltaje registrado se aplicaba una oscilación en la punta de la micropipeta a través del amplificador. De esta manera se facilitaba el ingreso del electrodo al interior de la neurona. En ese momento se registra un cambio en el voltaje correspondiente a un valor cercano al potencial de membrana de la neurona. Se aplica corriente directa (DC) negativa para hiperpolarizar la membrana, evitar una ráfaga continua de potenciales de acción y estabilizar a la neurona. Previamente se ha cambiado el programa de estimulación. Se

aplican pulsos hiperpolarizantes y despolarizantes con una duración de 300 ms a una frecuencia de 0,2 Hz. Los pulsos despolarizantes permiten comprobar su patrón de potencial de acción y el hiperpolarizante permite evidenciar si la neurona se encuentra adecuadamente compensada con respecto a la resistencia del electrodo. Esta técnica a ciegas permite identificar las neuronas sin necesidad de una visualización directa de la misma. El patrón de disparo así como la resistencia permiten inferir si se está registrando una célula piramidal.

3.6. Parámetros a Evaluar

Se evaluaron las siguientes propiedades electrofisiológicas de las neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo:

3.6.1. Propiedades Pasivas de la Membrana

- Potencial de membrana o Potencial de Reposo para cada neurona. Dicho registro se realizó con $DC=0$ una vez la neurona se encontraba estable. En una serie final de experimentos igualmente se indujo una hiperpolarización de la membrana. Se registró el cambio de potencial de membrana con respecto al registro control 10 minutos previos.

- Resistencia de Entrada (Input Resistance).

La resistencia de entrada (R_i) es un parámetro calculado a partir de la ley de Ohm ($R_i = V/I = (V_2 - V_1)/(I_2 - I_1)$). Se aplicó un pulso de corriente hiperpolarizante constante durante todo el registro a través del electrodo interno y se registró el cambio del potencial de la membrana dependiendo del protocolo. La R_i es expresada en Mega Ohmios ($M\Omega$).

3.6.2. Propiedades Activas de la membrana

- Potencial de Acción: Tras una serie de pulsos de corriente despolarizantes de 0 hasta 300 pA y 300 ms de duración, se registraron diferentes parámetros con respecto al potencial de Acción: Amplitud, Umbral, Patrón de Disparo, ADP (postdespolarización) APH (post hiperpolarización) (Fig. 11).

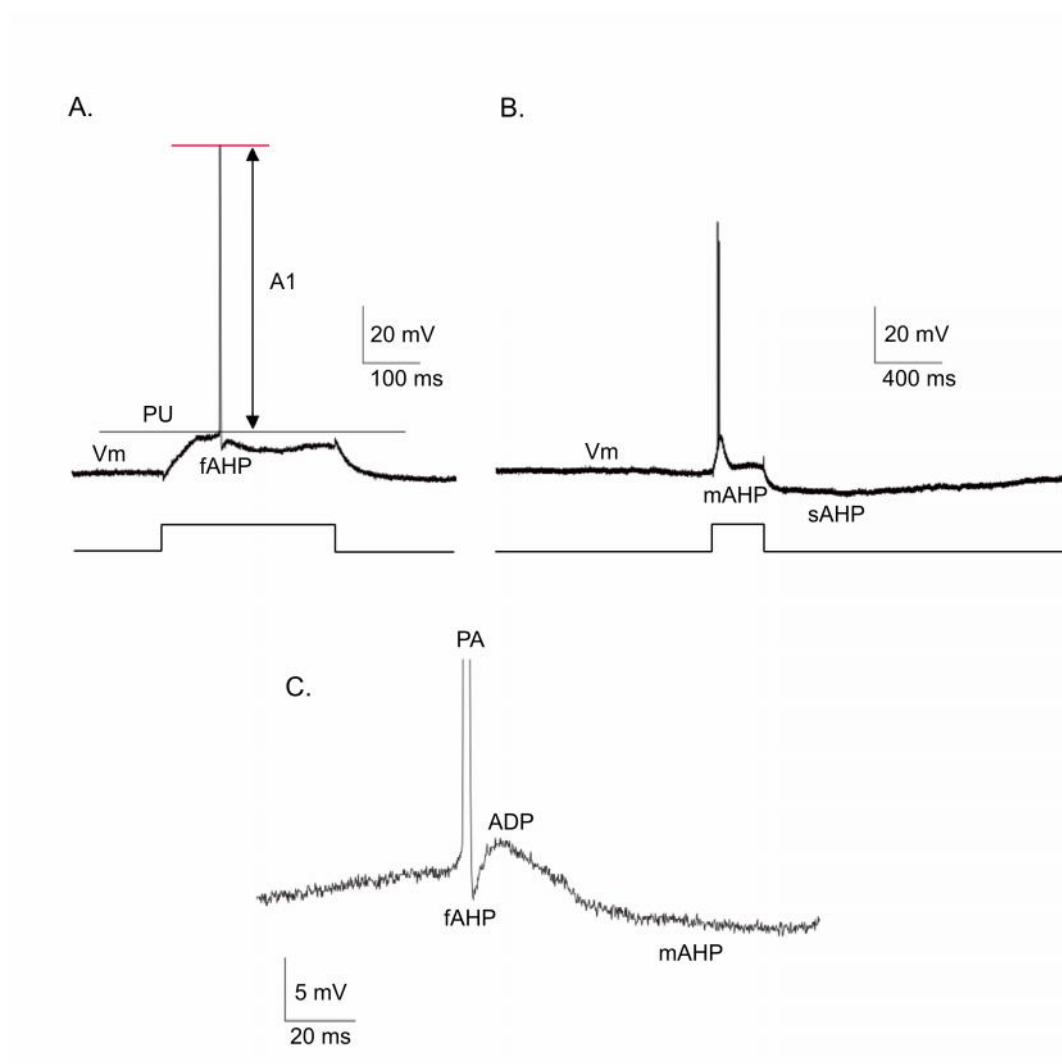


Fig. 11. Representación gráfica de las propiedades pasivas y activas de la membrana evaluados a partir de una línea base correspondiente con el potencial de membrana (V_m) y del umbral (PU). A. Medición de propiedades activas tras un pulso de corriente despolarizante en neuronas piramidales de CA3. A1, amplitud del potencial de acción medido desde el umbral; PU, Potencial umbral; fAHP, posthiperpolarización rápida (Fast AHP). B. En otra neurona con una escala de tiempo mayor, se evidencian: mAHP, posthiperpolarización media (Medium AHP) y sAHP, posthiperpolarización lenta (Slow AHP). C. Tras un potencial de acción (PA) se registra: fAHP; ADP, Post despolarización (Afterdepolarization) y mAHP.

3.6.3. Potenciales Sinápticos Provocados.

Tras estimular la fimbria se registró los Potenciales Postsinápticos Excitatorios e Inhibitorios y sus parámetros correspondientes (Fig. 12):

Latencia: tiempo transcurrido desde el estímulo externo (artefacto) hasta el inicio del potencial sináptico.

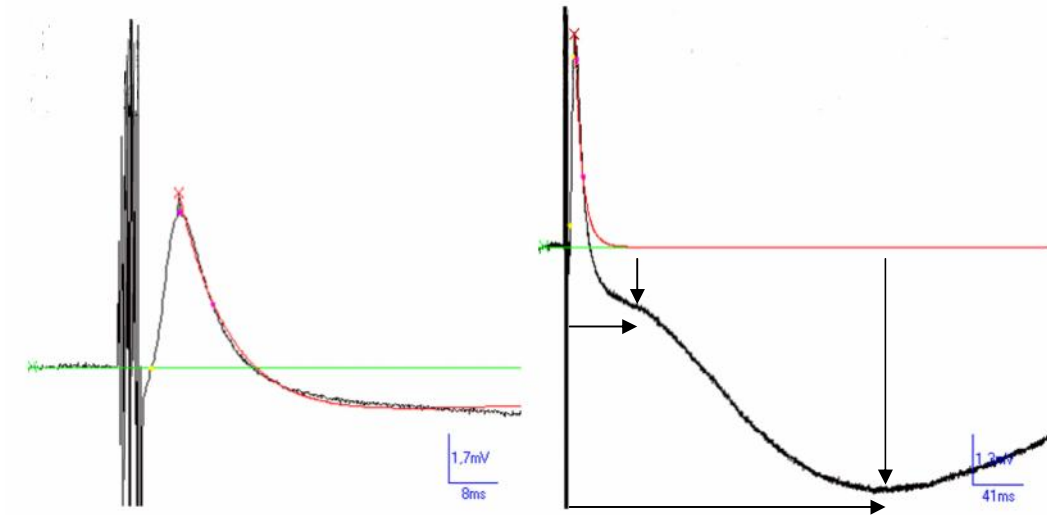
Amplitud: diferencia de voltaje desde el la mayor deflexión (cresta) hasta el potencial de membrana.

Duración: Tiempo transcurrido desde el inicio hasta el final del potencial sináptico.

Tiempo de Subida (Rise Time): tiempo transcurrido desde el 10 al 90% de la amplitud

Tiempo de Caída (Decay Time): tiempo transcurrido desde el 90 al 37% de la amplitud

A.



B.

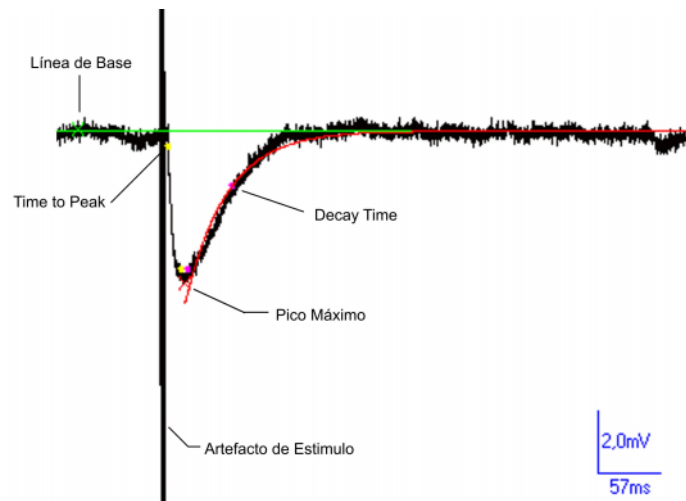


Fig. 12. Representación promedio de Potenciales Excitatorios e Inhibitorios provocados tras estimular la fimbria. A. Izq. A partir de una línea base (línea verde), se midió la amplitud del Potencial Excitatorio (pico máximo señalado con cruz roja). Der. En respuestas sinápticas complejas, se tomaron los puntos de máxima deflexión (respuesta sináptica compleja con dos componentes negativos), con respecto a línea base (línea roja), así como la latencia a partir del artefacto de estímulo. Flechas verticales en referencia a la amplitud, flechas horizontales en referencia a la latencia. B. Se registraron los parámetros Rise Time (desde el 10 al 90% de la amplitud: puntos amarillos); Decay Time (desde el 90 al 37% de la amplitud: puntos púrpura); potencial de membrana en reposo: línea verde.

Solo se registraron aquellas neuronas que presentaban un potencial de membrana estable durante por lo menos 10 minutos previos a la administración de los fármacos, con potenciales de membrana mayores de -55 mV, con valores de Resistencia Interna cercanos a 110 M Ω , y con un patrón de potencial de acción característico para neuronas piramidales de CA3.

3.7. Adquisición y Análisis de las Respuestas Neuronales

Como se dijo anteriormente, para la visualización directa de la señal se utilizó un osciloscopio y mediante la técnica de fijación de corriente (configuración current-clamp) se registraron los parámetros anteriormente mencionados. Luego de que la señal es amplificada (Bio Logic VF180), los datos son transferidos a un ordenador con procesador Pentium III de 450 MHz, usando una interfase convertidora analógica digital CE 1401 plus. Para la adquisición de los datos por el ordenador se utilizó el programa Spike 2 Capture para Windows, de Cambridge Electronic Design. Se utilizó una velocidad de muestreo de 6250 Hz tanto para datos relacionados con propiedades pasivas de la membrana, como para los datos correspondientes con propiedades activas de la membrana y los potenciales sinápticos.

Para el análisis de datos se utilizó el programa Mini Analysis versión 6.0.7 de Synaptosoft Inc. Estos datos fueron previamente convertidos a formato ABF mediante un conversor binario incluido en el mismo programa. Los parámetros se midieron a partir de una línea base de 250000 ms previo a la pendiente del pico inicial.

3.8. Fármacos

Los fármacos fueron preparados y alicuotados para ser disueltos en un volumen final de 50 ml de solución de Krebs, la cual era aplicada a la preparación por el sistema de perfusión.

- Péptido Beta Amiloide (25-35): Se administró a tres dosis crecientes de 0,5 μ M, 1,0 μ M y 1,5 μ M. Las dosis fueron escogidas teniendo en cuenta estudios previos en similares condiciones experimentales (Rush et al., 1992; Ashenafi et al., 2005).

- Tetrodotoxina (TTX): se utilizó para bloquear los canales de sodio voltajes dependientes a dosis de 1 μ M, y así inhibir la transmisión presináptica (Catterall, 1980; Kao et al., 1986).
- 6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-diona (CNQX): es un antagonista de los receptores AMPA/Kainato. Dosis empleada de 10 μ M (Watkins et al., 1990; King et al., 1992).
- D-(-)-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid (D-APV): antagonista competitivo de los receptores NMDA. Dosis empleada 50 μ M (Schulte et al., 1994; Takeda et al., 2010).
- Bicuculline Methiodide (Bicuculina): es un antagonista de los receptores GABA A. Se emplearon dosis de 10 μ M (Lee et al., 2005; Kurt et al., 2006).
- (*RS*)-3-Amino-2-(4-chlorophenyl) propylphosphonic acid (Saclofen): Antagonista selectivo de los receptores GABA B. Es un derivado análogo del agonista Baclofen. Se emplearon dosis de 0,2 mM (Karlsson et al., 1988; Romei et al., 2009).
- (*RS*)-4-Amino-3-(4-chlorophenyl) butanoic acid (Baclofen): Es un agonista selectivo de los receptores GABA B. La dosis utilizada para inducir una hiperpolarización en rodajas es mayor de 10 μ M, en nuestro caso empleamos 14 μ M (Berthelot et al., 1991; Xie et al., 2006).
- Tertiapin-Q: es un bloqueante de alta afinidad de los receptores de potasio rectificadores de entrada acoplados a proteínas Gs (GIRK 1/4). Las dosis empleadas en rodajas van entre los 100 nM y 1 μ M. En nuestro caso se han empleado dosis entre los 0,5 μ M a 1 μ M (Jin et al., 1999; Avshalumov et al., 2003).
- 2-methyl-2,4-pentanediol (MPD): Es un alcohol también conocido como Hexylene glycol, el cual produce una acción directa de los canales GIRK aumentando su conductancia; efectos no dependientes de proteínas Gs. Se han empleado dosis de hasta 100mM. En nuestras condiciones se ha empleado una dosis de 50 mM para mantener la viabilidad de la preparación (Aryal et al., 2009).

3.9. Caracterización Morfológica Neuronal

Para verificar la morfología neuronal luego del registro electrofisiológico, en algunas neuronas se aplicó el trazador intracelular Biocitina (Tocris Bioscience), conjugado natural de biotina y lisina. En este caso los microelectrodos de registro contenían en su interior biocitina al 2% en acetato potasico 2M. Dicho trazador fue aplicado iontoforéticamente mediante la inyección de corriente de 0,2 nA a 3-5 Hz, durante 15 minutos (adaptación del protocolo descrito por Carrascal et al., 2009). Luego de un periodo de incubación de 30 minutos, la rodaja fue fijada en glutaraldehído al 1,25% en tampón fosfato 0,1M, pH 7,6 durante 35 minutos. Tras dos lavados con tampón fosfato 0,1 M de 15 minutos cada uno, la rodaja fue introducida en sacarosa al 30% en tampón fosfato 0,1M por 24 horas. Luego fueron cortadas por un microtomo de congelación, para obtener secciones de 45 μ m de grosor, que se recogieron en tampón fosfato 0,1 M. A continuación se inhibió la peroxidada endógena con peróxido de hidrógeno al 30%. Luego de lavados sucesivos con tampón fosfato 0,1M y Tris salino (NaCl 8,5%) 0,05 M con Triton X-100, se procedió a la incubación con el complejo de rábano biotinada (ABC, Laboratorios vector) durante 3 horas. Se reveló la biocitina con 375 μ m de 3'-3'-diaminobencidina como cromógeno y la reacción se intensificó con 100 mg de sulfato de amonio y níquel. Las secciones fueron lavadas con Tris-HCL 0,05 M, y se montaron en portaobjetos gelatinizados y se dejaron secar. Se contratiñó el tejido con Violeta de Cresilo y se cubrió con Entellan (medio de montaje) para su visualización al microscopio.

3.10. Estadística y Representación Gráfica

Mediante el programa estadístico "SigmaPlot 11.0" se analizaron las diferencias entre grupos para cada una de las variables estudiadas. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía con tratamiento como factor. Las diferencias estadísticamente significativas se evaluaron *post hoc* mediante la prueba Holm-Sidak. Para realizar las comparaciones intragrupalas se utilizó la prueba t de medidas repetidas. En ese sentido los registros fueron comparados con respecto al valor control para cada célula (10 minutos iniciales del registro). Para agrupar los datos fueron normalizados con respecto sus propios valores control. Cuando no existían criterios de normalidad luego del test de Kormogorov-Smirnov, se emplearon pruebas no paramétricas. Se utilizó como índice de significancia estadística un nivel de probabilidad de $p = 0.05$.

Para la representación grafica, luego de promediar 10 barridos con el programa Mini Analysis 6.0.7 de Synptosoft y Spike 2 o luego de seleccionar un registro representativo, dicho registro era guardado como Metafile. Posteriormente fue tratado con el programa CorelDRAW Graphics Suite 12 para su representación.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterización Electrofisiológica de las Neuronas de CA3. Propiedades Intrínsecas.

Mediante la técnica de registro intracelular en la modalidad de fijación de corriente (*current clamp*), se registraron los cambios en el potencial de membrana de las neuronas de la región CA3 (n=101). Tras un periodo de estabilización de 10 minutos, y luego de reducir la corriente DC a un valor cercano a cero para registrar las propiedades pasivas, se aplicaron pulsos de corriente hiperpolarizantes de intensidad constante con el fin de calcular su resistencia de entrada (R_i) y la constante de tiempo (τ). En promedio, las neuronas registradas presentaron un potencial de membrana en reposo de $-73,225 \pm 0,883$ mV, una R_i de $114,008 \pm 4,691$ M Ω y una constante τ de $77,246 \pm 19,911$ ms.

Mediante la inyección de corriente despolarizante, se identificaron dos tipos neuronales dependiendo del patrón de descarga de los potenciales de acción: neuronas de espiga simple (correspondiente al 42% del total registrado) y neuronas con espigas de 2 a 4 potenciales de acción al inicio del pulso (58% con respecto al total) (Fig. 13).

Las neuronas de espiga simple se caracterizan por generar un solo potencial de acción (Fig. 13 A) independiente de la cantidad de corriente despolarizante inyectada, mientras que las neuronas de múltiples espigas incrementan el número de potenciales a medida que se incrementa la amplitud del estímulo, así mismo, las espigas subsecuentes al primer potencial de acción presentan un amplitud mucho menor (Fig. 13 B). En la tabla 2 se presentan diferencias y similitudes en cuanto a las propiedades pasivas y activas de ambos tipos neuronales.

Además de las diferencias en cuanto al número de potenciales de acción generados, el potencial umbral de las neuronas de múltiples espigas es menor en comparación con las neuronas de espiga única. Sin embargo, debido a que no se registraron diferencias significativas en muchos otros parámetros registrados (Tabla 2), se agruparon los datos obtenidos en ambos tipos de neuronas para su posterior análisis.

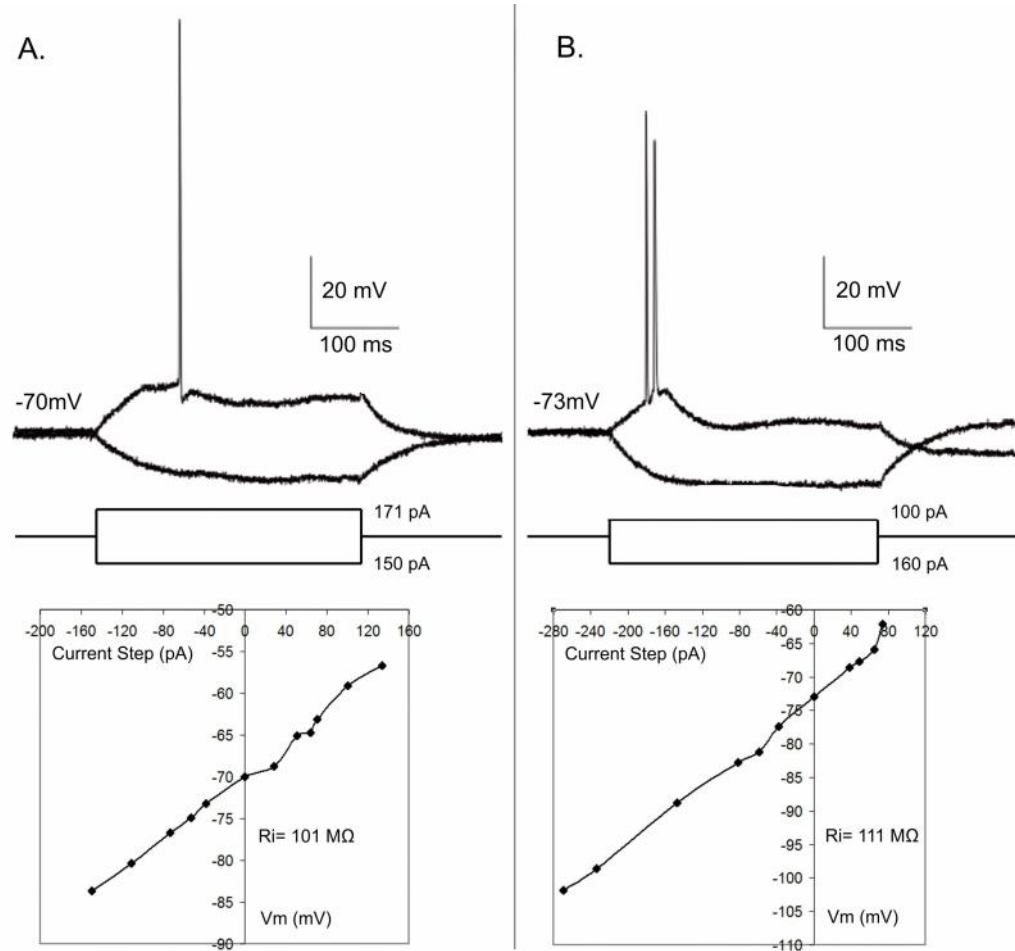


Fig. 13. Tras la inyección de corriente despolarizante, se registraron dos patrones de descarga de los potenciales de acción. A. Corresponde a una neurona de espiga simple, acompañada de una AHP rápida. En esta misma neurona tras una serie de pulsos despolarizantes e hiperpolarizantes se calculó una resistencia interna (R_i) de 101 M (curva I – V en la parte inferior). B. El segundo tipo de neurona, corresponde a un patrón de espigas rápidas de 2 a 4 potenciales de acción de menor amplitud al inicio del pulso, acompañado de una rápida adaptación y una AHP media. La R_i calculada en este caso fue de 111 M .

4.2. Morfología de las Neuronas Registradas en CA3

Después del registro electrofisiológico, algunas neuronas fueron inyectadas iontoforéticamente con neurobiotina y tras revelado con la técnica ABC se evidenció su morfología. Las rodajas fueron contrateñidas con violeta de cresilo. Tanto neuronas de espiga simple como aquellas de múltiples potenciales de acción al inicio del pulso, presentaron una típica morfología piramidal sin evidenciarse diferencias notorias en la distribución de su soma y árbol dendrítico (Neurona representativa en Fig. 14).

Propiedades de membrana en neuronas piramidales de CA3			
Propiedades de la Membrana	Neurona de Espiga única	Neurona de Múltiples Espigas	Diferencias (Prueba t y Mann-Whitney U)
Potencial de Membrana (Vm) (mV)	-71,0 ± 1,34	-73,9 ± 0,90	t = 1,840 P = 0,079
Potencial Umbral (PU) (mV)	-58,6 ± 1,61	-63,6 ± 1,31	t = 2,422 P = 0,022 (*)
Resistencia interna (M Ω)	106,90 ± 7,48	119,08 ± 5,86	t = -1,299 P = 0,208
Constante de tiempo (τ) (ms)	76,70 ± 28,51	77,70 ± 30,19	P = 0,792 Mann-Whit. U
Amplitud del Pot. Acción (mV)	104,8 ± 4,03	97,9 ± 2,32	t = 1,611 P = 0,119
ADP (mV)	4,43 ± 0,53	2,84 ± 0,49	t = 1,979 P = 0,067
fAHP (AHP rápida) (mV)	5,87 ± 0,77	5,38 ± 0,77	P = 0,699 Mann-Whit. U
mAHP (AHP media) (mV)	10,2 ± 1,30	10,7 ± 1,61	t = -0,207 P = 0,838
sAHP (AHP lenta) (mV)	16,9 ± 1,17	18,3 ± 1,45	t = -0,721 P = 0,479

Tabla 2. Se muestra los promedios y error estándar (SEM \pm) de cada parámetro para cada tipo neuronal. Diferencias significativas (* P < 0,05; n = 30).

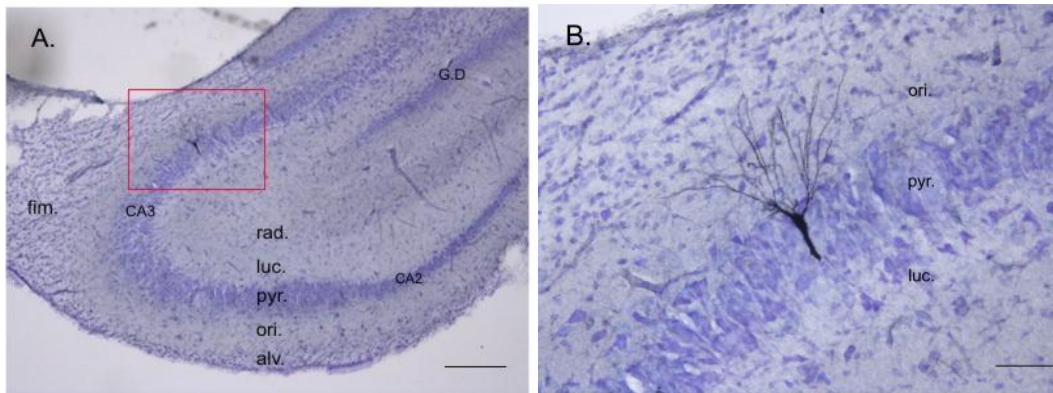


Fig. 14. A. Fotomicrografía de una rodaja de hipocampo de 45 μm que muestra una neurona marcada con biocitina (recuadro rojo) luego de su registro intracelular. Escala: 200 μm . B. A mayor escala, se observa su morfología piramidal, así como su dendrita basal. Escala: 50 μm . Alv: *alveous*; ori: *stratum oriens*; pyr: *stratum pyramidale*; luc: *stratum lucidum*; rad: *stratum radiatum*; fim: fimbria; G.D: giro dentado.

4.3. Caracterización de la Sinapsis Fimbria-CA3. Respuestas Sinápticas en Neuronas de CA3 tras Estimulación Ortodrómica de la Fimbria

4.3.1. Respuestas Sinápticas Simples: Potencial Excitatorio e Inhibitorio Postsináptico

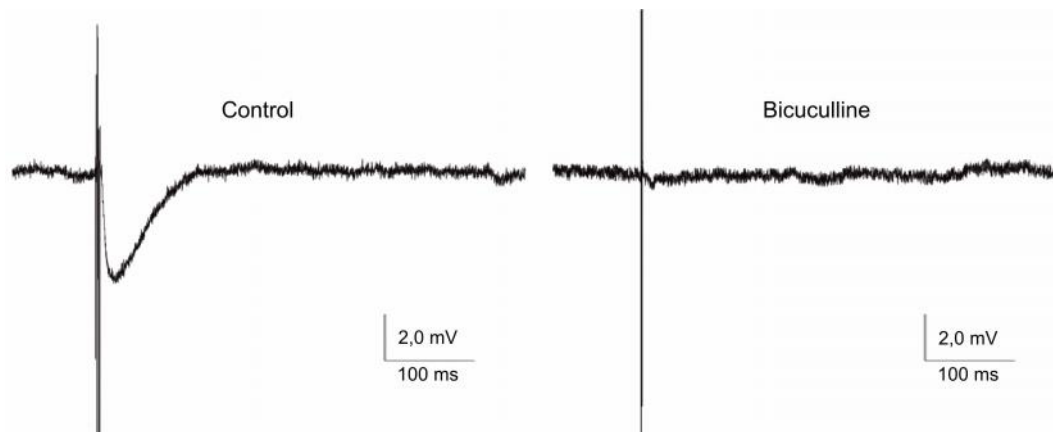


Fig. 15. Tras la estimulación ortodrómica de la fimbria en una neurona piramidal de CA3, el Potencial Inhibitorio Postsináptico de corta latencia es bloqueado completamente tras la perfusión con Bicuculina, por lo tanto depende de la activación de receptores GABA A.

En un grupo de neuronas en situación control ($n=5$), el estímulo de la fimbria generó un Potencial inhibitorio Postsináptico de corta latencia (17 ± 3 ms) con los siguientes parámetros en promedio: Amplitud de $-4,7 \pm 0,31$ mV, Tiempo de Caída (*Decay Time*) de $44,6 \pm 4,85$ ms, Tiempo de Subida (*Rise time*) de $17,29 \pm 2,61$ ms, duración media de $51,2 \pm 8,1$ ms y un área bajo la curva de $192,9 \pm 54,39$ mVms. Dicha respuesta fue

bloqueada completamente tras aproximadamente 8 minutos de perfusión con Bicuculina, lo que indica su dependencia a los receptores GABA A (Fig. 1 5).

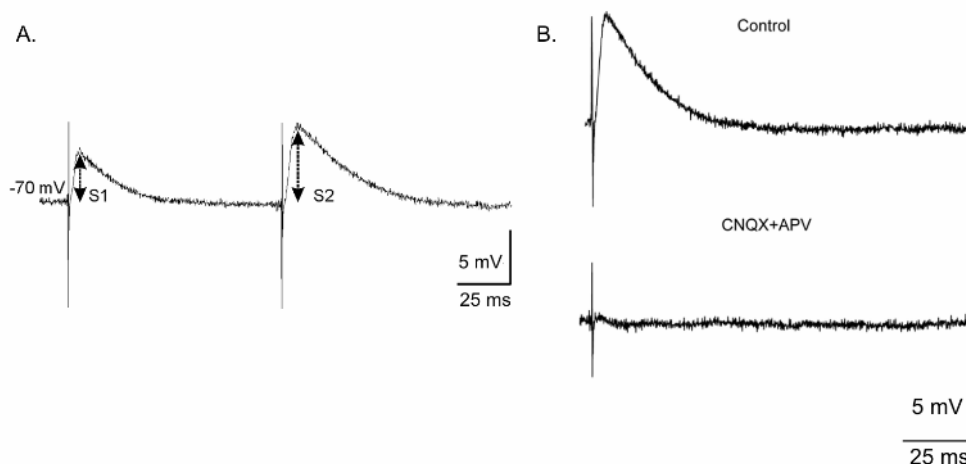


Fig. 16. A. Registro de Potenciales Excitatorios Postsinápticos (PEPS: S1 y S2) provocados por dos estímulos en fimbria a un intervalo de 100 ms. Se observa el fenómeno de facilitación por pulsos pareados (S2 de mayor amplitud que S1). B. Potencial Excitatorio Postsináptico simple bloqueado tras la perfusión con CNQX y APV, indicando su origen glutamatérgico.

En otro grupo de neuronas en situación de control ($n=6$) se registró un Potencial Excitatorio Postsináptico con las siguientes características : Amplitud de $6,41 \pm 0,91$ mV, tiempo de repolarización (*Decay time*): $40,36 \pm 6,03$ ms; tiempo de despolarización (*Rise Time*): $17,17 \pm 4,5$ ms; Duración media de $34 \pm 5,64$ ms; Área bajo la curva $200,01 \pm 28,6$ mVms. En un protocolo de pulsos pareados con intervalo entre pulsos entre 100 a 120 ms, se presentó el fenómeno de f acilitación (S1: 5,3 mV; S2: 8,2 mV). Dichas respuestas sinápticas fueron bloqueadas cuando se perfundió con CNQX y APV, lo cual indica su carácter glutamatérgico AMPA y NMDA (Fig. 1 6 A y B).

4.3.2. Respuesta Sináptica Compleja: Potencial Excitatorio Postsináptico e Inhibitorios Temprano y Tardío

Tras la estimulación ortodrómica de la fimbria, algunas neuronas piramidales ($n= 11$) respondieron con una respuesta sináptica compleja (Fig. 17) consistente en un PEPS inicial (con latencia de $6,52 \pm 0,56$ ms), acompañado por un PIPS de corta latencia (PIPS temprano): $30,375 \pm 1,361$ ms, y posteriormente por un PIPS de larga latencia ($247,375 \pm 6,63$) (PIPS tardío). Para la caracterización de esta respuesta compleja se emplearon tres metodologías. Para determinar si la respuesta es de origen mono o

polisináptico se realizó una caracterización mediante variaciones en la amplitud del estímulo externo; para determinar si cada componente presenta un potencial de inversión asociado al potencial de equilibrio a un ión específico se realizaron variaciones en el potencial de la membrana y finalmente, se realizó una caracterización farmacológica para determinar los receptores implicados en cada componente.

4.3.2.1. Caracterización Mediante Variaciones en la Amplitud del Estímulo Externo

En el presente protocolo, se incrementó progresivamente la intensidad de estimulación en la fimbria mientras se registraba la respuesta sináptica. Este incremento progresivo en el estímulo genera un aumento en el número de fibras presinápticas reclutadas (Papoyan, 1997), con lo cual el componente PIPS tardío incrementa su amplitud, así como el componente PIPS temprano y el PEPS (Fig. 18). Por otro lado, con un estímulo de baja intensidad se registra una respuesta monosináptica excitatoria de corta latencia ($4,75 \pm 0,25$ ms). El incremento en la intensidad del estímulo genera una respuesta polisináptica de mayor latencia (PIPS tardío y temprano con latencias de $31,5 \pm 3,5$ y $243,25 \pm 5,25$ respectivamente).

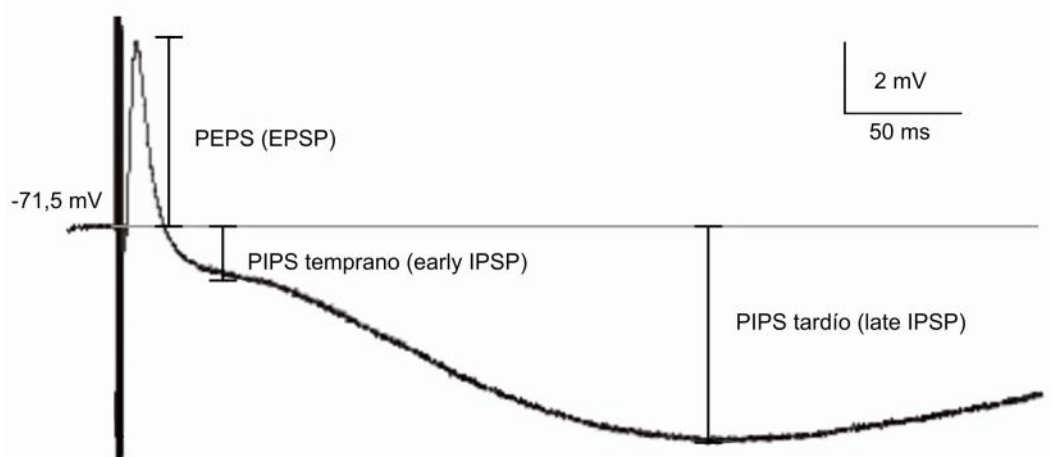


Fig.17. Tras la estimulación ortodrómica de la fimbria, se registra una respuesta sináptica compleja en neuronas piramidales de CA3 (promedio de 118 registros). Esta respuesta sináptica compleja presenta tres componentes: un componente excitatorio (PEPS), seguido de un componente inhibitorio rápido y de corta latencia (PIPS temprano: early IPSP o Fast IPSP en su denominación en inglés), y finalmente, un PIPS de larga duración y larga latencia (PIPS tardío: late IPSP ó slow IPSP en su denominación en inglés).

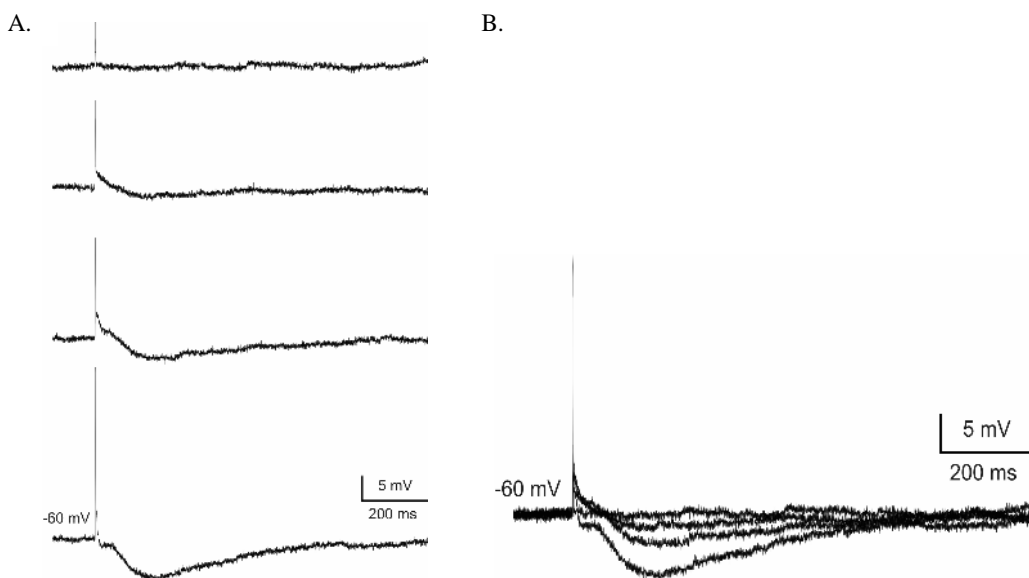


Fig.18. Respuestas sinápticas provocadas en una célula piramidal de CA3 tras estimulación ortodrómica de la fimbria. A. A medida que se incrementa la amplitud del estímulo en fimbria, se incrementa igualmente la amplitud de los PEPS y PIPS. En la parte inferior se evidencia una respuesta sináptica compleja frente a la máxima estimulación externa. B. Al sobreponer los registros se observa que el componente inhibitorio se hace más evidente conforme se incrementa la amplitud de estimulación.

4.3.2.2. Caracterización de la Respuesta Mediante Variaciones en el Potencial de Membrana en Reposo

Mediante la inyección de corriente, fue posible inducir variaciones en el potencial de membrana mientras se registraban los 3 componentes sinápticos provocados por estimulación de la fimbria. Esto permitió determinar el potencial de inversión aproximado para los componentes inhibitorios: el PIPS temprano ($E_{e.PIPS}$) presentó un potencial de -61,0 mV y el PIPS tardío ($E_{l.PIPS}$) de -80 mV (Fig. 19).

Los potenciales de reversión para el PIPS temprano y el PIPS tardío, se corresponde con los descritos en otros estudios, e igualmente se relacionan con las conductancias y los potenciales de equilibrio para el potasio en el caso del PIPS tardío, con el del cloro para el caso del PIPS temprano. Estudios clásicos han indicado que estos componentes varían su amplitud en función de las modificaciones en los niveles extracelulares para cada uno de estos iones (Kehl y McLennen, 1985; Washburn y Moises, 1992).

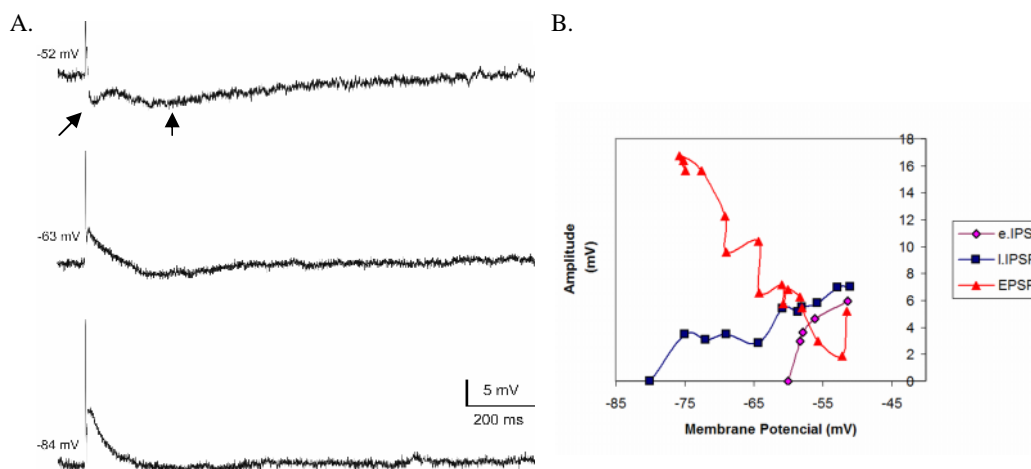


Fig. 19. Respuestas sinápticas provocadas en una célula piramidal de CA3 tras estimulación ortodrómica de la fimbria. A. La estimulación de la fimbria genera una respuesta excitatoria (PEPS- EPSP), seguida de dos respuestas inhibitorias (flechas): PIPS temprano y PIPS tardío. A medida que se hiperpolariza la membrana, el componente inhibitorio se reduce mientras el excitatorio se incrementa. B. Efectos de la variación en el potencial de membrana sobre la amplitud de PEPS y PIPS. P IPS temprano (e.IPSP) y PIPS tardío (l.IPSP).

4.3.2.3. Caracterización Farmacológica

Con el fin de determinar los receptores implicados en cada una de las respuestas sinápticas, se procedió al bloqueo farmacológico de cada uno de los componentes de la respuesta sináptica compleja.

La caracterización farmacológica nos indica que el componente excitatorio depende de la activación de los receptores glutamatérgicos ionotrópicos AMPA y NMDA (Fig. 20 D); el componente PIPS temprano depende de los receptores GABA A y el componente PIPS tardío depende de los receptores GABA B (Fig. 20A y B). Finalmente, la respuesta sináptica inhibitoria parece depender de la activación de interneuronas GABAérgicas, que son a su vez activadas por aferentes glutamatérgicas (Fig. 20 C). Esta afirmación se relaciona con el hecho de que un incremento en el estímulo a nivel de la fimbria aumenta el número de fibras glutamatérgicas reclutadas, que a su vez aumentan el número de interneuronas GABAérgicas activas (Papoyan, 1997; Schneiderman et al., 1992). Estudios previos indican que los receptores GABA B tienen una ubicación principalmente extrasináptica, y por lo tanto la activación de los mismos depende del fenómeno de *spillover*, es decir una liberación suficiente de GABA que sea capaz de difundir por fuera del espacio sináptico (Scanziani, 2000). Este mecanismo

explicaría como un incremento en la estimulación de la fimbria se acompaña de un incremento en el componente GABA B y una estimulación de baja amplitud solo genera un PEPS.

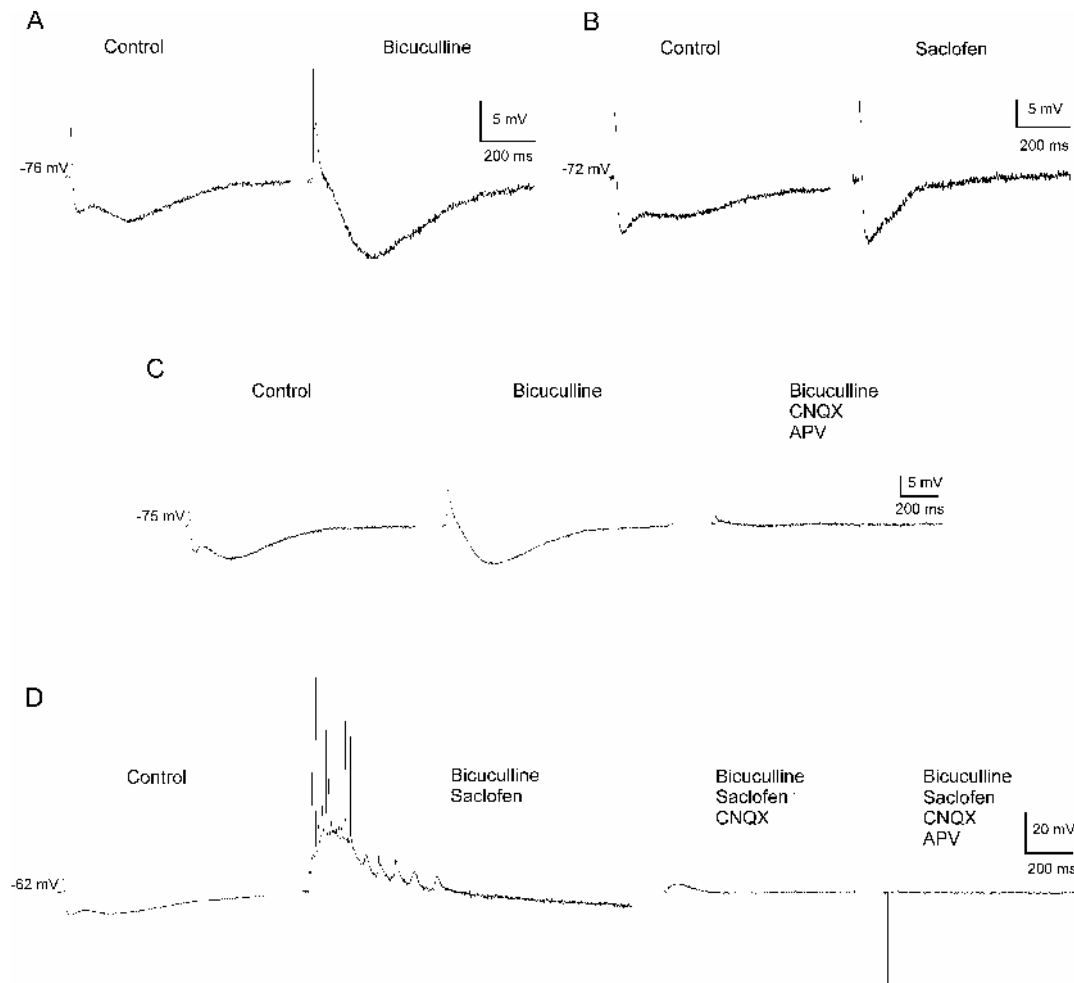


Fig. 20. A. Registro de la respuesta sináptica compleja tras estimulación de la fimbria en una neurona piramidal de CA3, donde se observa una marcada reducción del PIPS temprano luego de su perfusión con Bicuculina, indicando que dicho componente depende de los receptores GABA A.

B. Bloqueo del PIPS tardío luego de su perfusión con Saclofen, lo cual se asocia a un ligero incremento del PIPS temprano. Esto indica que dicho componente tardío depende de receptores GABA B.

C. El bloqueo del componente PIPS temprano con Bicuculina se asocia con un marcado incremento en la amplitud del PEPS. Tanto la respuesta excitatoria como inhibitoria fueron bloqueadas por CNQX y APV (antagonistas glutamatérgicos).

D. Tanto el PIPS temprano como tardío fueron bloqueados por Bicuculina y Saclofen, lo cual a su vez generó un incremento del potencial excitatorio acompañado por una ráfaga de potenciales de acción. Esta respuesta fue bloqueada inicialmente por CNQX y finalmente por APV.

4.4. Efectos del Beta Amiloide (25-35) sobre las Características Intrínsecas de las Neuronas Piramidales de CA3

Una vez obtenido el registro control (registro estable mínimo de 10 minutos), durante el cual se determinaron las características de disparo, las propiedades activas, el potencial de membrana así como la respuesta sináptica de las neuronas piramidales de CA3, se procedió posteriormente a perfundir la preparación con el péptido A a concentraciones crecientes. Sus efectos se comparan con respecto a este registro control inicial.

4.4.1. Potencial de Membrana

Para estudiar los efectos del A (25-35) sobre el potencial de membrana, se perfundió la preparación con concentraciones crecientes de este péptido (0,5 μ M, 1,0 μ M y 1,5 μ M) durante un mínimo de 10 minutos para cada dosis. A medida que se incrementan las concentraciones de A (registro representativo en Fig. 21) se genera una despolarización progresiva de la membrana de $6,2245 \pm 1,63$ mV (n=4). Dicha despolarización fue evidente de forma indirecta en otro grupo de células (n=5), en las cuales fue necesario administrar corriente DC hiperpolarizante para mantener el potencial de membrana estable. Estas variaciones en la inyección de corriente fue estadísticamente significativa a concentraciones de 1,0 μ M (t = 2,557; p = 0,021) y 1,5 μ M (t = 4,301; p = <0,001) y no se observaron diferencias a concentraciones de 0,5 μ M (t = 0,842; p = 0,412). La despolarización de la membrana inducida por dosis crecientes de A se registró incluso en aquellas preparaciones bajo perfusión con TTX (bloqueante selectivo de los canales de sodio voltaje dependientes) (Fig. 30). Puesto que la TTX bloquea la generación de potenciales de acción y por lo tanto la transmisión sináptica, los efectos despolarizantes del A deben tener un origen postsináptico.

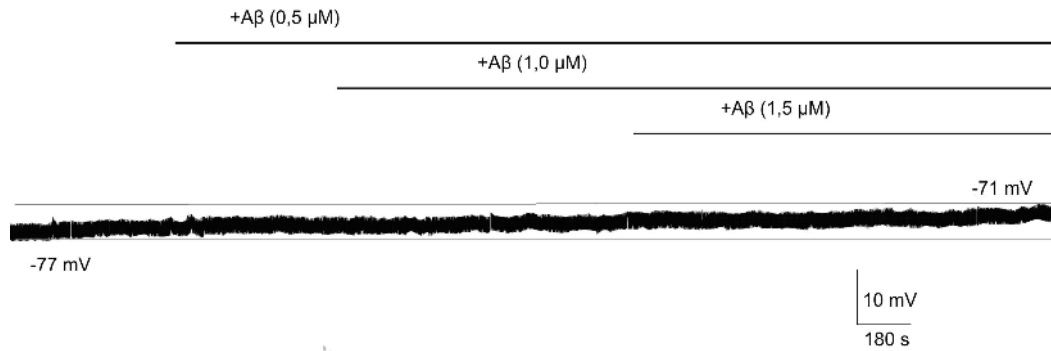


Fig. 21. Registro representativo del potencial de membrana en reposo en condiciones basales y tras la perfusión a concentraciones crecientes de Aβ. El Aβ genera una despolarización significativa de la membrana en función del tiempo y la concentración ($t = -14,512$; $P = <0,001$).

4.4.2. Efectos del Aβ sobre Diferentes Propiedades de la Membrana: Potencial de Acción, Potencial umbral, ADP y AHP

Dado que las variaciones en el potencial de membrana afectan la amplitud del potencial de acción, así como otros parámetros (R_i , ADP y AHP), los siguientes experimentos se realizaron manteniendo constante la V_m mediante la inyección de corriente directa DC.

Tabla 3. Efectos del Aβ sobre las Propiedades de Membrana				
Propiedad de membrana	Control	Aβ (0,5 μM)	Aβ (1,0 μM)	Aβ (1,5 μM)
Amplitud Pot. Acción	100,02 ± 2,57	110,1 ± 3,75	96,4 ± 2,77	92,8 ± 4,29
Umbral	-60,9 ± 1,19	-56,1 ± 3,16	-57,5 ± 1,18	-57,1 ± 1,71
ADP	4,5 ± 0,49	5,4 ± 1,10	3,95 ± 0,89	4,0 ± 0,57
fAHP	5,7 ± 0,81	5,4 ± 1,01	3,5 ± 0,95	4,3 ± 1,002
mAHP	8,4 ± 1,48	9,1 ± 1,12	14,3 ± 1,37 *	11,3 ± 0,97
sAHP	17,1 ± 1,43	16,4 ± 4,20	21,2 ± 1,64	21,0 ± 1,87

Tabla 3. Se muestra los promedios (mV) y error estándar (SEM ±) de cada parámetro. Diferencias significativas con respecto al valor control (* $P < 0,05$; $n = 20$).

Por medio del análisis de ANOVA de una vía con factor grupo, se muestra que el Aβ no afecta la amplitud del potencial de acción ($F(3,50) = 2,615$; $P = 0,062$), tampoco se registraron diferencias en el potencial umbral ($F(3,50) = 2,138$; $P = 0,108$), ni en la ADP

($F(3,22) = 0,576$; $P = 0,638$), ni la fAHP ($F(3,31) = 1,222$; $P = 0,320$), finalmente tampoco en la sAHP ($F(3,33) = 1,625$; $P = 0,204$) (Tabla 3).

En el caso de la mAHP se observó un incremento significativo ($F(3,35) = 3,966$; $P = 0,016$) a una concentración de $1,0 \mu\text{M}$ ($t = 3,344$; $P = 0,002$), un incremento no significativo a $1,5 \mu\text{M}$ ($t = 1,544$; $P = 0,132$), y sin diferencias a $0,5 \mu\text{M}$ ($t = 0,266$; $P = 0,792$) (Fig. 22).

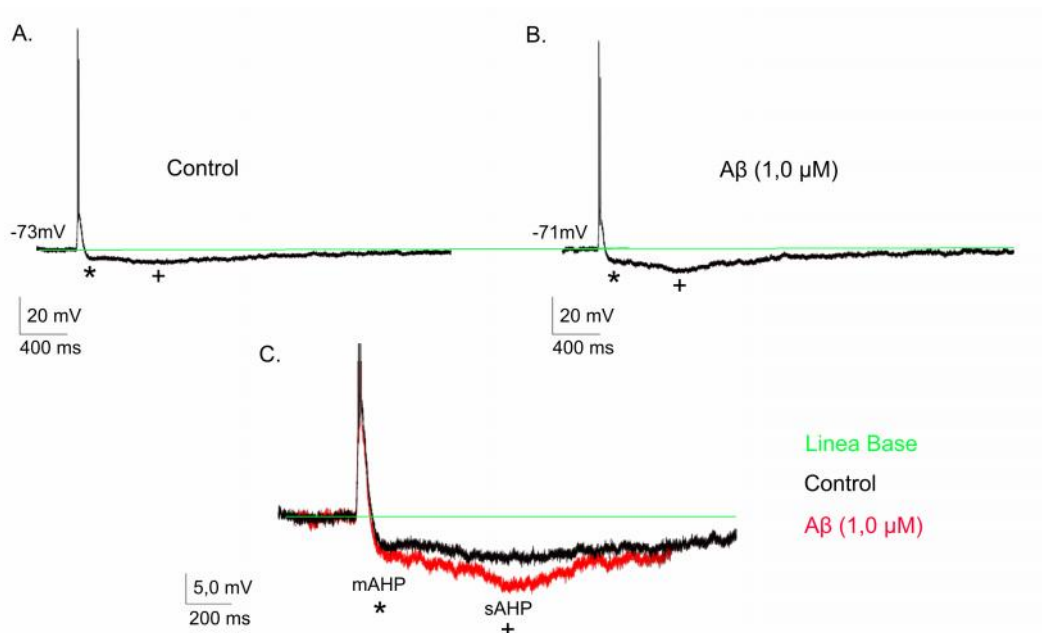


Fig. 22. Registro representativo de los efectos del $\text{A}\beta$ ($1,0 \mu\text{M}$) sobre la mAHP (*) y sobre la sAHP (+) en la actividad espontánea de una neurona piramidal de CA3. A menor escala (A y B) se muestra que el $\text{A}\beta$ no afecta la generación de los potenciales de acción; además no se evidencian cambios significativos en la amplitud de la espiga. A mayor escala (C) se evidencia un incremento en la amplitud del mAHP acompañado de un incremento de sAHP (aunque este último hallazgo no se observó en todas las neuronas).

4.4.3. Efectos del $\text{A}\beta$ sobre el Patrón de Disparo Neuronal

Se han registrado las variaciones en el número de potenciales de acción tras aplicar corriente despolarizante de 300 ms en condiciones control y bajo perfusión con $\text{A}\beta$ ($n=20$). En el 45% de los casos ($n=9$), se presentaron variaciones con respecto al patrón de disparo dependiendo del tipo de neurona registrada: en el caso de las neuronas que descargan con una sola espiga, la perfusión con $\text{A}\beta$ generó un incremento en el número de potenciales de acción, mientras que en las neuronas que descargan con múltiples espigas se genera reducción en el número de potenciales de acción. Estos cambios se relacionan con modificaciones en la cantidad de corriente necesaria para generar el

potencial de acción (Fig. 23). A concentraciones de A de 0,5 μM no se registraron modificaciones en el patrón de descarga.

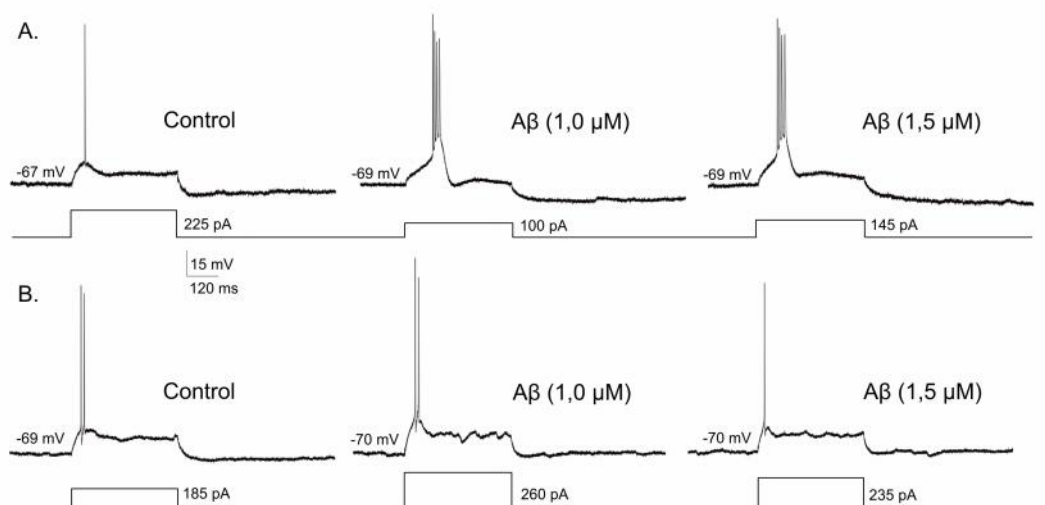


Fig. 23. Efectos del A sobre el patrón de potencial de acción. A. En una neurona de una sola espiga, se evidencia que el A induce un incremento en el número de potenciales de acción, efecto que es acompañado por una menor cantidad de corriente necesaria para la generación del mismo. B. En una neurona de múltiples espigas, se observa una reducción en el número de potenciales de acción, así como un incremento en la cantidad de corriente necesaria para superar el umbral.

4.4.4. Resistencia Interna de la Membrana

Como en los anteriores experimentos, los resultados que se describen en esta sección se obtuvieron manteniendo el potencial de membrana constante por inyección de corriente DC. Dadas las amplias variaciones entre neuronas en cuanto al valor de su R_i (resistencia interna), se comparó el valor relativo de R_i para cada neurona con respecto a su valor control ($R_i \text{ medido}/R_i \text{ control} \times 100\%$; $n=16$). Los resultados muestran que la exposición del tejido a concentraciones crecientes de A indujo un incremento significativo de la resistencia interna de la membrana a una concentración de 1,0 μM ($t = -2,635$; $P = 0,018$) y a 1,5 μM ($t = -3,236$; $P = 0,007$). No se encontraron diferencias a concentraciones de 0,5 μM (Mann-Whitney U Statistic= 10,000; $P = 0,690$) (Fig. 24A y B). Así mismo, la administración previa de TTX, no es capaz de revertir dichos efectos, lo cual indica un mecanismo postsináptico (Fig 24 C y 29 B).

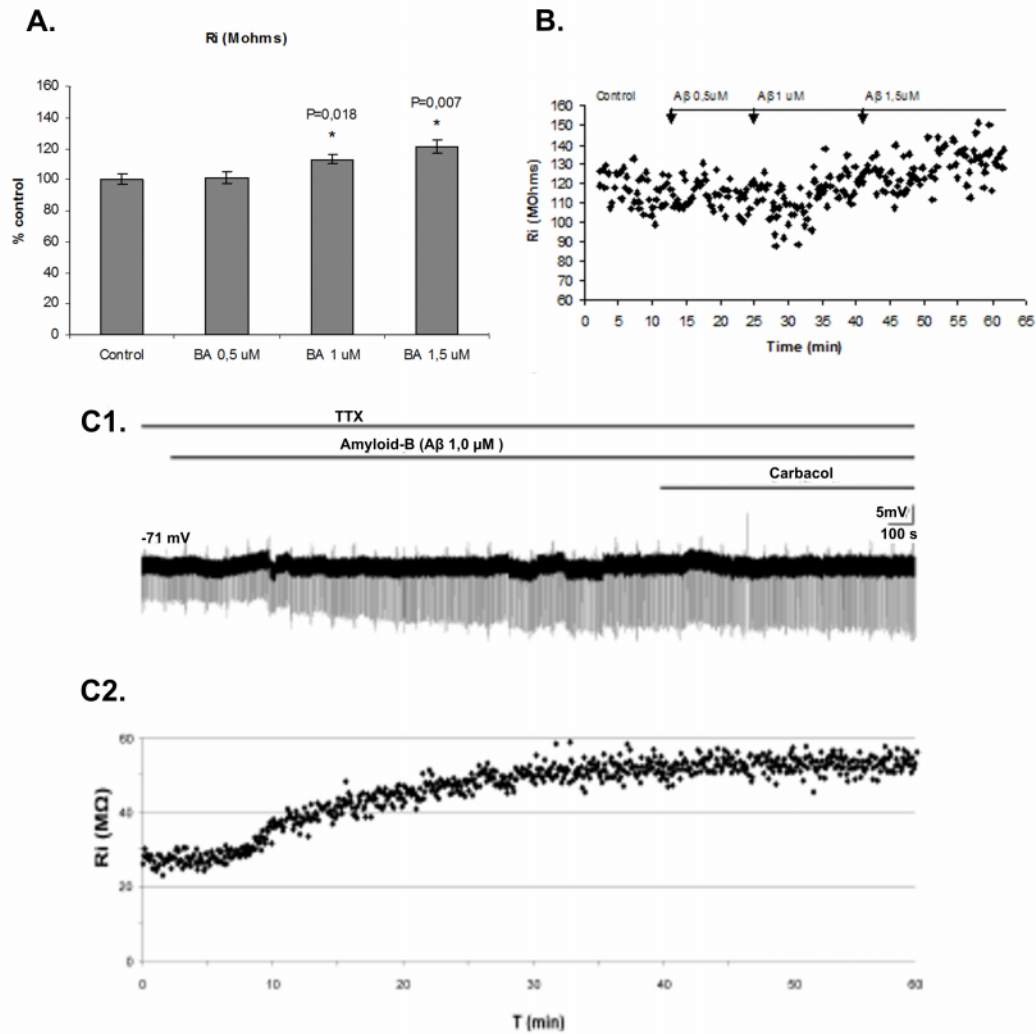


Fig. 24. Efectos del A (25-35) sobre la Ri de las neuronas de CA3. A. En un análisis normalizado se muestra un incremento significativo de la Ri a concentraciones de 1,0 μ M y 1,5 μ M con respecto al control (n=16). B. En un registro representativo se muestra el curso temporal de los efectos del A sobre la Ri. Nótese que dicho incremento se hace notorio a partir de una concentración de 1 μ M. C1. Registro de una neurona de CA3, en la cual se aplicaron pulsos hiperpolarizantes para registrar la Ri. El potencial de membrana se mantuvo constante con la inyección de corriente D.C. C2. La perfusión con TTX (1,0 μ M) en la misma neurona no previene el incremento en la Ri inducido por A (1,0 μ M), lo cual indica su origen postsináptico. La perfusión final con un agonista colinérgico (carbacol 10 μ M) no generó cambios adicionales en la Ri luego de la perfusión prolongada con A.

4.5. Efectos del Beta Amiloide sobre la Respuesta Sináptica Inhibitoria Fimbria-CA3

Para el presente experimento se empleó un grupo de neuronas piramidales con respuesta sináptica compleja tras estimular la fimbria (n=12). Se determinó la amplitud de los componentes sinápticos en condiciones control y durante la perfusión a dosis crecientes

de A. Puesto que tanto el PIPS temprano como el PIPS tardío dependen de los receptores GABA A y GABA B respectivamente (Fig. 20 A y B), se infiere que los efectos del A sobre la amplitud de dichos componentes se deben a que afecta la actividad ya sea del receptor, de su efector final en la membrana o bien a la liberación del neurotransmisor.

Los distintos efectos del A sobre los componentes inhibitorios permitieron identificar dos grupos de neuronas. En un primer grupo de 9 neuronas, el A generó una reducción significativa en el componente sináptico mediado por GABA B a concentraciones de 1,0 μM ($t = 2,532$; $P = 0,030$) y a 1,5 μM ($t = 2,519$; $P = 0,036$), sin encontrarse diferencias a 0,5 μM ($t = 1,133$; $P = 0,295$) (Fig. 25). En este mismo grupo, el A no generó modificaciones significativas en la amplitud del componente mediado por GABA A ($H = 2,578$; $P = 0,461$), sin embargo se generó un incremento en el componente glutamatérgico - PEPS ($t = -2,503$; $P = 0,046$) a una dosis de 1,5 μM . Dado que los efectos del A sobre ambos componentes inhibitorios son diferenciales, no se considera que la reducción del componente GABA B se deba a una reducción en la liberación del neurotransmisor, ya que el componente GABA A mantuvo su amplitud a lo largo del experimento. Este resultado sugiere un posible efecto postsináptico selectivo.

Finalmente, en otro grupo de neuronas ($n=3$) no se registraron cambios en los componentes postsinápticos inhibitorios inducidos por A; así mismo, en estas neuronas tampoco se observaron cambios en la R_i , ni en el potencial de membrana (V_m) durante la perfusión con A (datos no presentados). Este resultado indica que hay un grupo de neuronas resistentes a los efectos del A y que la sensibilidad al A implica variaciones en la R_i y en la respuesta sináptica de manera selectiva. Bajo nuestras condiciones experimentales, es posible mantener un registro fiable de la actividad sináptica y de las propiedades de la membrana durante un periodo relativamente largo de tiempo (aproximadamente 1 hora); por lo tanto las modificaciones en dichos parámetros son atribuidos únicamente a los efectos tóxicos del A y no a un deterioro de la preparación.

4.6. Mecanismos Propuestos para Explicar los Efectos del Beta Amiloide sobre la Respuesta Sináptica Inhibitoria

4.6.1. Correlación entre Ri y Componentes Sinápticos

Se realizó un análisis de correlación (Pearson) entre la amplitud de cada uno de los componentes sinápticos con respecto al valor respectivo de Ri teniendo en cuenta su relación temporal, en una neurona expuesta a dosis crecientes de A desde 0,5 μ M hasta 1,5 μ M (Fig. 26 y 27). En todos los casos el coeficiente de correlación indica que las variaciones en la Ri se acompañan igualmente de cambios en cada uno de dichos componentes ($P = <0,0001$) y que estos cambios siguen el mismo curso temporal. En este sentido se observa que a medida que el componente GABA B se reduce, la Ri se incrementa ($R = -0,484$); mientras que en el caso de GABA A ($R = 0,307$) y el PEPS glutamatergico (0,429) esta correlación fue positiva (Fig. 27).

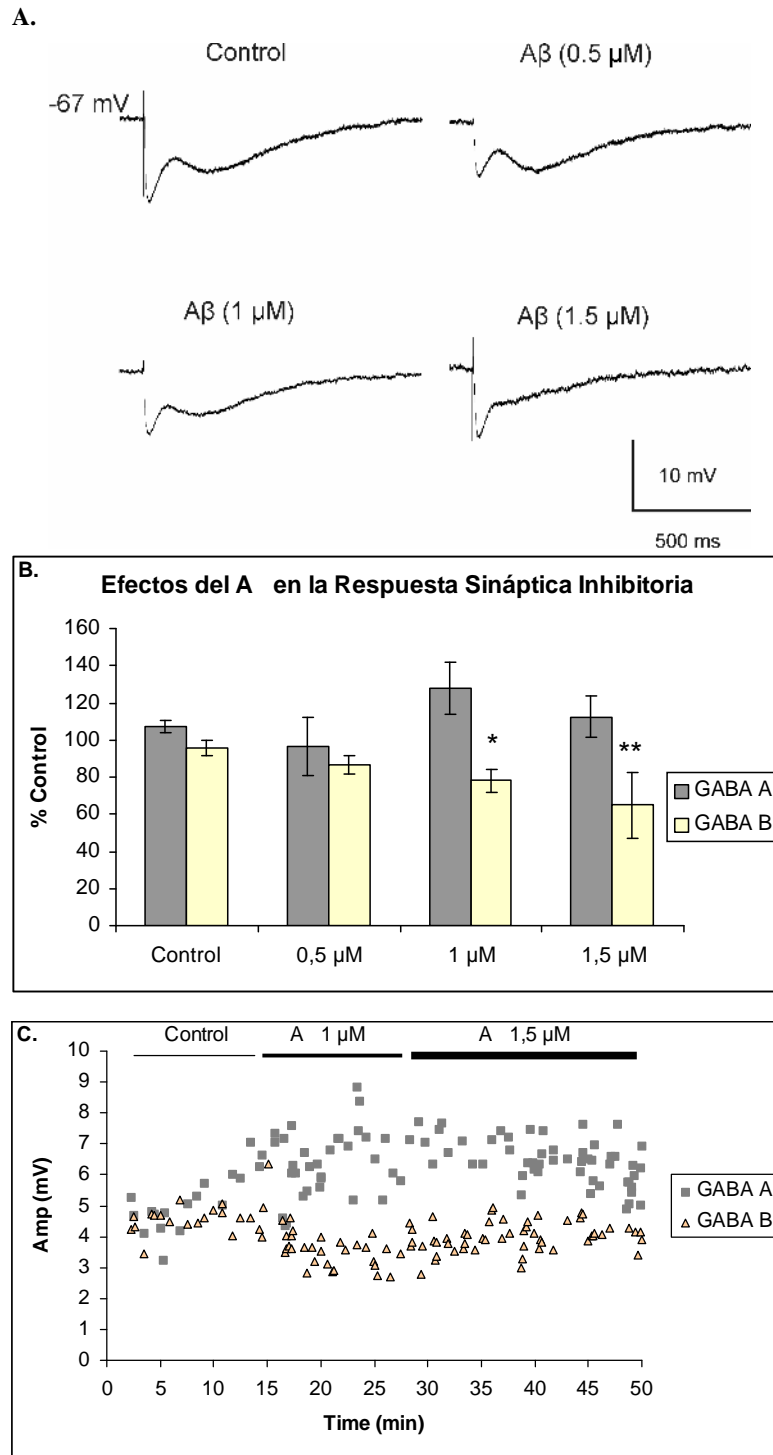


Fig. 25. A. Efectos del A (25-35) sobre los componentes inhibitorios sinápticos en una neurona piramidal de CA3 tras estimulación ortodrómica de la fimbria. En el registro control se observa n los componentes inhibitorios: PIPS temprano y tardío. A partir de una concentración de A de 1 μ M y 1,5 μ M se observa una reducción en la respuesta inhibitoria tardía. B. Valores relativos de los componentes sinápticos GABA A y GABA B (PIPS temprano y tardío respectivamente) con respecto al valor control para cada neurona (n= 9). Se evidencia una reducción significativa del componente GABA B a partir de una concentración de 1,0 y 1,5 μ M. C. En un registro representativo se muestra el curso temporal de los efectos del A sobre los componentes inhibitorios.

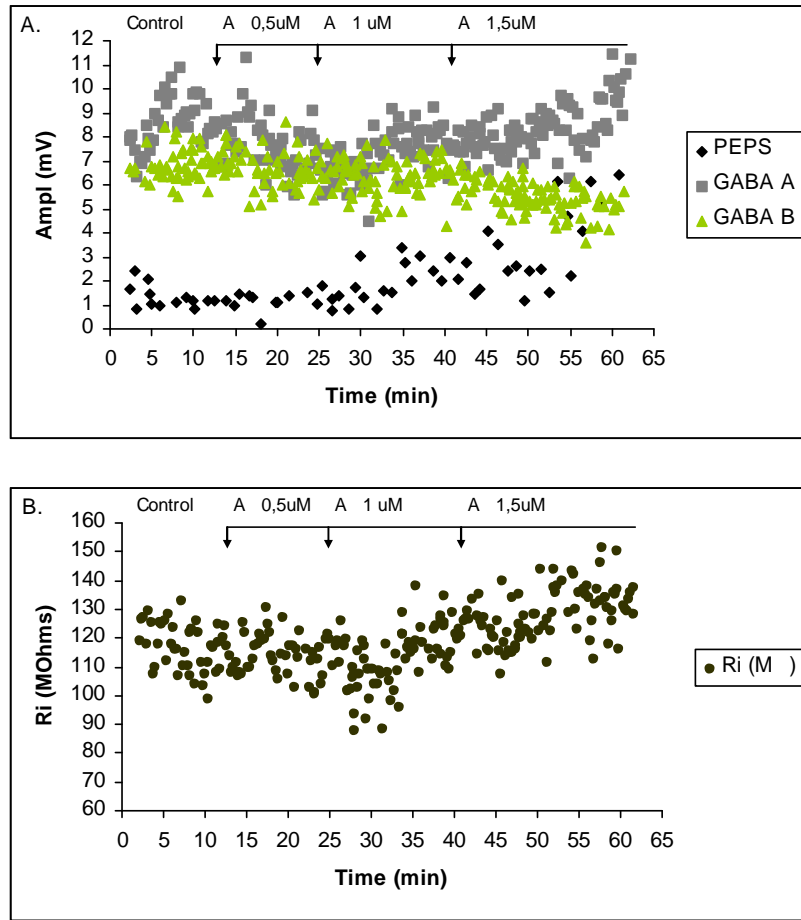


Fig. 26. Efecto del A sobre los componentes sinápticos y la Ri en función del tiempo. A. En un registro representativo se muestran los efectos de dosis progresivas de A sobre la amplitud de los componentes GABA A y GABA B (PIPS temprano y tardío), así como del PEPS glutamatergico. Se observa una reducción progresiva del componente GABA B, así como un ligero incremento en los componentes GABA A y PEPS. B. Nótese que los anteriores resultados se relacionan con un incremento en la Ri en términos de su relación temporal y concentración de A.

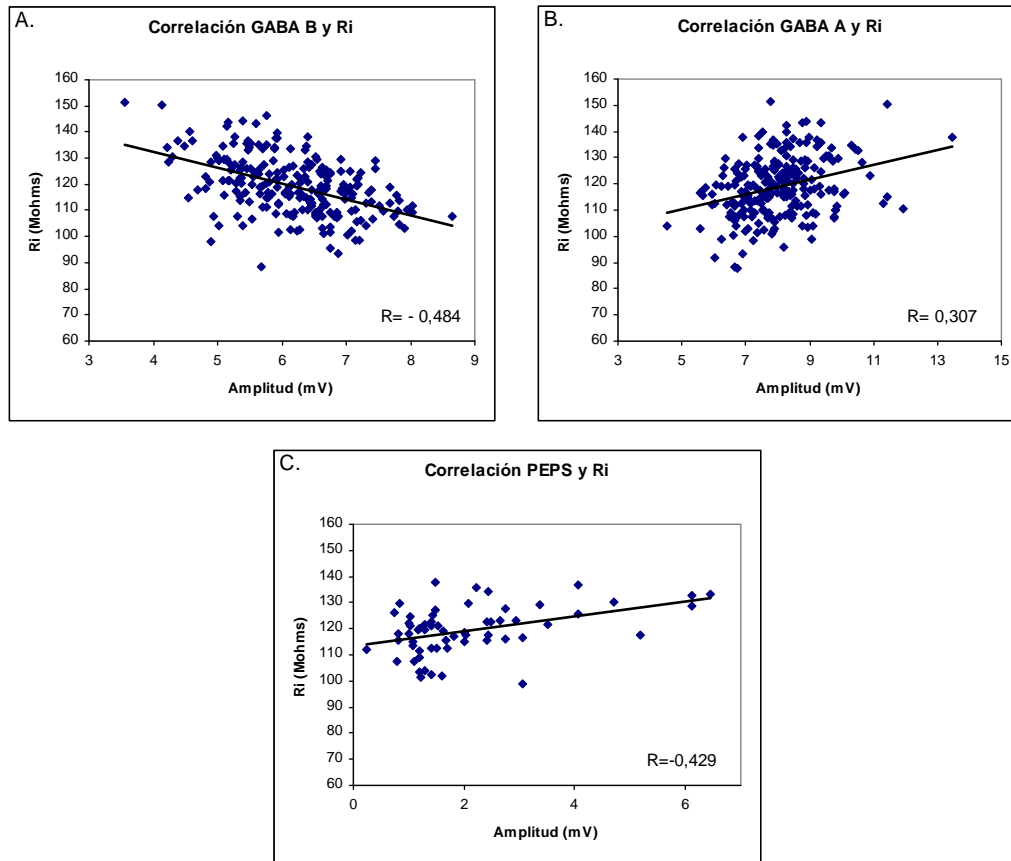


Fig. 27. Gráficos de dispersión donde se representa la resistencia de la membrana (R_i) en función de la amplitud para cada componente sináptico, en una neurona expuesta a dosis crecientes de A. A. Una reducción en el componente GABA B se correlaciona con un incremento en la R_i ($R = -0,484$). B. Correlación positiva entre el componente GABA A y R_i ($R = 0,307$). C. Correlación positiva entre el componente PEPS y R_i ($R = 0,429$). El coeficiente de correlación indica una relación estadística mente significativa para los tres componentes ($P = <0,0001$) siendo mayor para el componente GABA B, seguido por el componente PEPS, y finalmente el componente GABA A.

4.6.2. Los cambios inducidos por A (25-35) en la Resistencia de entrada (R_i) pueden estar relacionados con una reducción en la conductancia de los canales GIRK acoplados al receptor GABA B

La despolarización generada por la perfusión con A (25-35) se asocia con un incremento en la resistencia de la membrana, y por lo tanto con una disminución de la conductancia de la membrana, lo que a su vez implica el cierre de canales iónicos. Dada la reducción significativa en el componente GABA B por acción del A y su correlación con un aumento concomitante en la R_i , parece lógico pensar que este efecto del A sobre la membrana puede generarse por un cierre de los canales GIRK y/o una

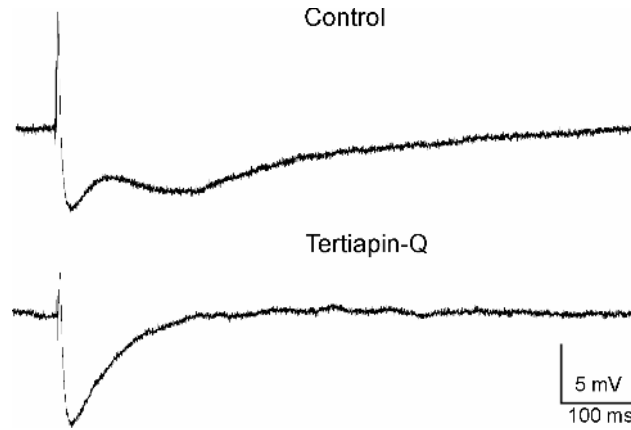
reducción en su conductancia. De hecho, el bloqueo de los canales GIRK por medio de un antagonista selectivo (tertiapin-Q), no solo bloquea el componente GABA B sino que además induce un incremento en la Ri, así como la despolarización de la membrana (Fig. 28). Estos efectos guardan una gran semejanza con los ya descritos por acción de dosis crecientes de A (25-35). Cabe resaltar que los mecanismos de acción del A deben ser más complejos e incluyen una constelación de efectos sinápticos, de señalización intracelular y sobre muchos otros receptores y canales iónicos. Sin embargo, hay una alta expresión de canales GIRK en las neuronas piramidales del hipocampo, los cuales modulan muchas de estas funciones neuronales (Drake et al., 1997; Chen y Johnston, 2005).

La inactivación de los canales GIRK acoplados al receptor GABA B, podría ser consecuencia de: a). un efecto del A sobre el receptor de superficie GABA B (así como su vía de señalización); b). un efecto sobre la transmisión sináptica en receptores acoplados al canal GIRK y finalmente c). un efecto directo sobre el canal GIRK. Para determinar el posible mecanismo de acción del A hemos bloqueado farmacológicamente cada uno de estos mecanismos y evaluado los posteriores efectos de la administración de dosis crecientes de A sobre la Ri (Fig. 29).

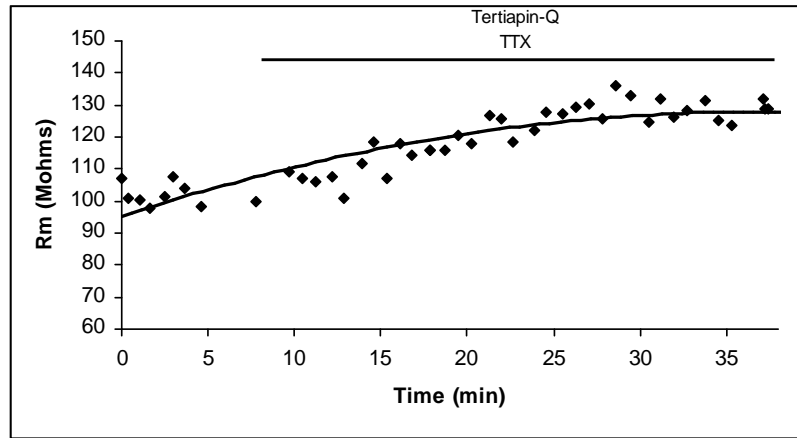
Como anteriormente se demostró, el A induce un incremento en la Ri a partir de una concentración de 1,0 μM y 1,5 μM (Fig. 24 y 29 A), lo cual se acompaña por una despolarización de la membrana (Fig. 21). El bloqueo de la transmisión sináptica por medio de TTX, no impide los efectos del A sobre la Ri (n=4): se muestra un incremento significativo a concentraciones de 1,0 μM ($t = -7,424$ $P = 0,018$) y 1,5 μM ($t = -7,519$; $P = 0,002$) con respecto al valor control. Curiosamente, a una concentración de 0,5 μM se registró una reducción significativa de la resistencia con respecto al control ($t = 4,765$; $P = 0,005$), sin embargo este valor no presenta diferencias con respecto a los niveles de Ri tras la perfusión con TTX (Mann-Whitney U; $P = 1,00$). A su vez, la TTX por si misma, no produjo modificaciones significativas en la Ri (Mann-Whitney U; $P = 0,700$) con respecto al control (Fig. 29B). Estos resultados indican la acción del A sobre mecanismos postsinápticos que involucran el cierre y/o apertura de canales iónicos de una manera dosis dependiente. Estudios previos indican que dependiendo del tiempo de exposición, los efectos del A sobre la apertura y cierre de los canales de potasio son variables. En este sentido, una exposición inicial de A a

bajas concentraciones puede inducir la apertura de canales de potasio, mientras que la exposición prolongada finalmente los cierra (Wang et al., 2009b).

A.



B.



C.

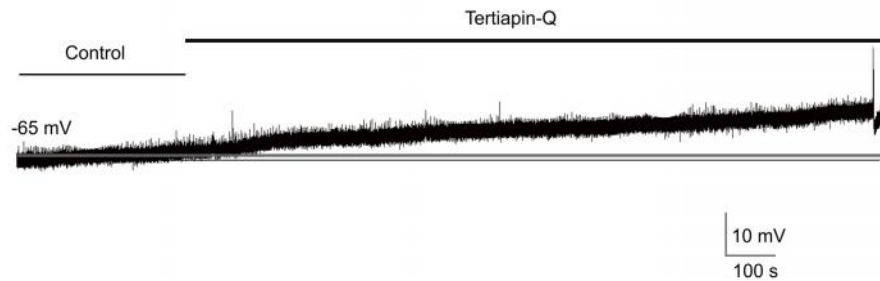


Fig. 28. El bloqueo de los canales GIRK simula muchos de los efectos del A sobre las propiedades de la membrana en las neuronas piramidales de CA3. A. Tertiapin-Q (0,5uM) bloquea completamente la respuesta sináptica GABA B (PIPS tardío) luego de 15 minutos de perfusión. B. El bloqueo de los canales GIRK produce un incremento en la Ri, el cual es limitado en el tiempo (nótese la meseta en el minuto 25). C. Los anteriores efectos se acompañan de una despolarización de la membrana.

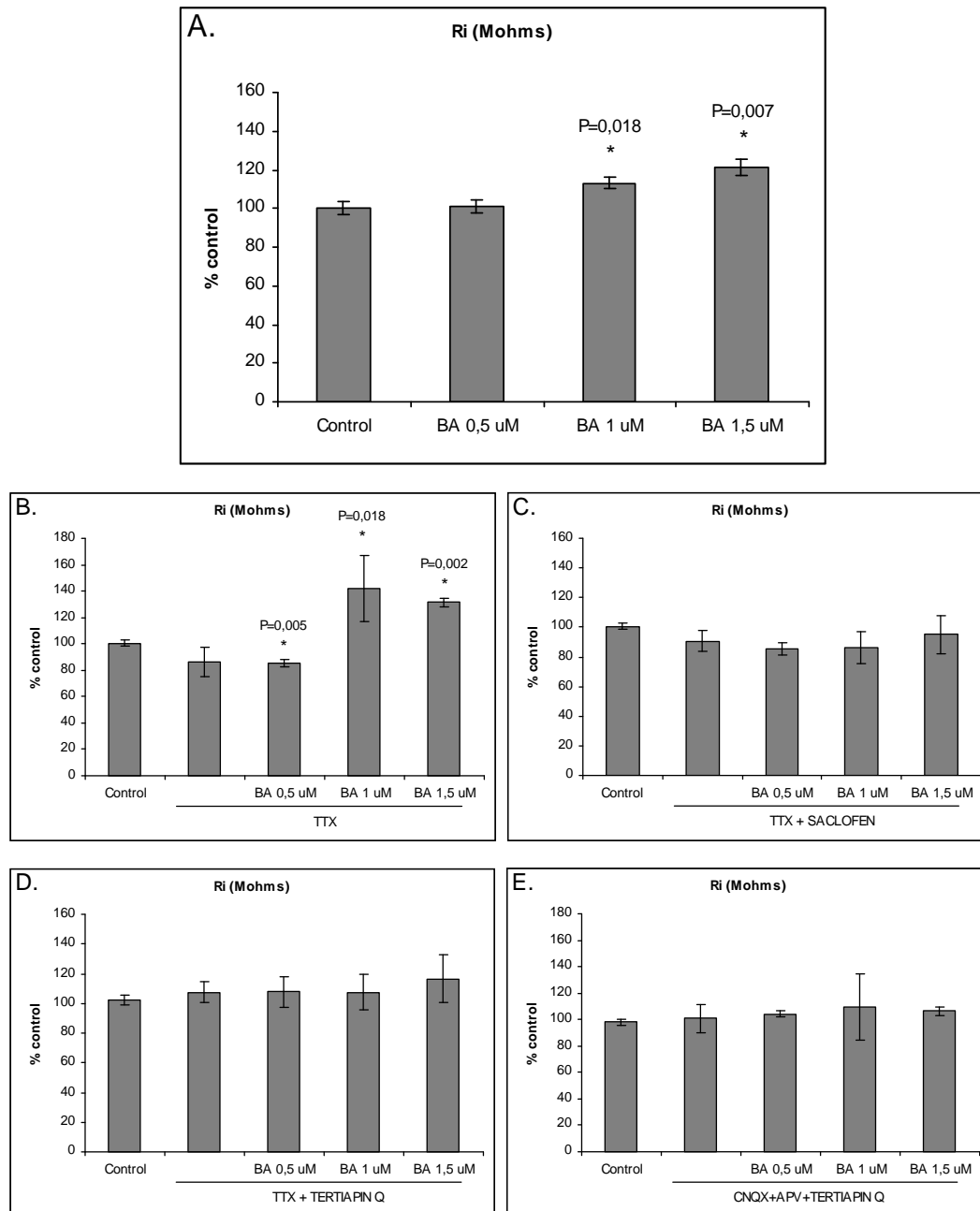


Fig. 29. Valores relativos promedio (% del control= $(Ri_{\text{control}} / Ri_{\text{medida}}) * 100\%$) de la Resistencia de entrada (Ri) después de la perfusión con A (25-25) a tres concentraciones progresivas. A. Se registra un incremento en la Ri inducido por A a concentraciones de 1 μM y 1,5 μM (n=16); B. El tratamiento previo con TTX, no previene los efectos del A sobre la Ri: se registra un incremento a una concentración de 1 μM y 1,5 μM , mientras que a 0,5 μM se registra una reducción con respecto al control (n=4). C. Luego del tratamiento con TTX y Saclofen (antagonista selectivo de los receptores GABA B), el A (0,5 μM y 1,5 μM) no se genera un incremento de la Ri (n=6). D. El tratamiento previo con TTX y Tertiapin-Q fue capaz de prevenir los efectos del A sobre la Ri (n=6). E. La administración conjunta de CNQX, APV y Tertiapin-Q igualmente fue capaz de prevenir los efectos de A sobre la Ri (n=3). Valores de significación estadística con respecto al valor control (*. $p < 0,05$).

Debido a que las variaciones en los componentes sinápticos PEPS y PIPS temprano se acompañan de modificaciones en la Ri (Fig. 27), se requirió la administración de TTX para bloquear la transmisión sináptica y evaluar los efectos postsinápticos que posiblemente explican la reducción del componente PIPS tardío y el incremento en la Ri. El bloqueo de los receptores postsinápticos GABA B tras la perfusión con TTX y Saclofen, de alguna manera previene el incremento en la Ri inducido por A (Fig.29C). Bajo estas condiciones experimentales (n=6), no se registraron diferencias significativas en la Ri con respecto al control ($H = 3,964$; $P = 0,411$). Este resultado sugiere una interacción entre la vía mediada por el receptor GABA B y el A (25-35).

Por otro lado, después de bloquear los canales tipo GIRK postsinápticos por medio de la perfusión de tertiapin Q junto con TTX por un periodo mayor de 15 minutos, el A fue incapaz de producir un incremento adicional en la Ri (n= 6): no se registraron diferencias significativas con respecto a los niveles de Ri tras la perfusión con tertiapin - Q y TTX ($F(4,27) = 0,220$; $P = 0,924$) (Fig. 29D). Este hallazgo confirma que el incremento en la Ri inducido por A se asocia a una reducción en la conductancia ($1/Ri$) de los canales GIRK. Sin embargo, debido a que la corriente a través de la membrana, es un factor que depende del número de canales, de su probabilidad de apertura, así como de su conductancia unitaria, con esta metodología no es posible determinar el mecanismo exacto del incremento en Ri mediado por A. Además, a dosis de A de 1,5 μM fue necesario en algunas neuronas inyectar corriente DC hiperpolarizante para mantener el potencial de membrana estable y evitar la despolarización.

Estudios previos indican que uno de los mecanismos de despolarización inducidos por A consiste en la activación de receptores metabotrópicos de glutamato, que a su vez ejercen efectos directos e indirectos sobre los receptores AMPA/NMDA así como despolarización mediada por calcio, y por efectos sobre la conductancia al clor o (Blanchard et al., 2002a y 2002b). En este sentido, la administración conjunta de tertiapin-Q y los antagonistas glutamatérgicos CNQX y APV no solo previenen el incremento en la Ri, si no que además no fue necesario administrar corriente DC para evitar la despolarización de la membrana: en un ANOVA por rangos, se evidencia que la combinación CNQX+APV + Tertiapin-Q (n=3), no incrementa la Ri ($H = 3,709$; $P = 0,447$) de manera significativa (Fig. 29 E).

4.6.3. Efectos del Beta Amiloide (25-35) sobre la hiperpolarización mediada por GABAB- GIRK

Puesto que las variaciones en la Ri pueden depender de múltiples factores y ser contaminadas por los efectos inducidos por A sobre muchos otros canales iónicos y receptores, diseñamos un nuevo protocolo para evaluar los efectos específicos del A sobre la respuesta GABA B.

Para confirmar si el A afecta la respuesta postsináptica mediada por la activación de receptores GABA B, se procedió a perfundir el tejido con TTX (con el fin de bloquear la transmisión sináptica), Bicuculina (para bloquear los receptores GABA A) y Baclofen (para activar los receptores GABA B). De esta manera fue posible inducir una hiperpolarización postsináptica de la membrana, la cual fue revertida por la administración de dosis crecientes de A (Fig. 30). Este experimento confirma el hecho que el A reduce la respuesta GABA B en la membrana postsináptica y además de que estos efectos son dosis y tiempo dependientes. Adicionalmente, se ha podido observar al final del registro una despolarización generada por el A, lo cual indica un mecanismo postsináptico. En condiciones normales el sistema GABA B tiene una actividad tónica muy escasa y únicamente cuando el sistema endógeno GABA B es activado mediante estimulación en la fimbria o con un agonista GABA B, la perfusión con un antagonista puede ser detectada (Bowery, 2006). Los efectos del A sobre la respuesta GABA B, pueden ser igualmente explicados por un efecto sobre el efector final GIRK, lo cual a su vez se relaciona con los efectos ya descritos del A sobre la Ri y la despolarización de la membrana.

Con el fin de revalidar estos datos y evaluar los efectos del A sobre la respuesta mediada por canales GIRK, hemos implementado el siguiente protocolo utilizando un agonista directo de los canales GIRK MPD (2-methyl-2,4-pentanol) (Aryal et al., 2009). Para ello, se generó una respuesta hiperpolarizante por activación de los receptores GABA B mediante la perfusión con TTX + Bicuculina + Baclofen, y además se añadió MPD (50 mM) a la preparación. En este caso, la hiperpolarización fue generada por dos mecanismos: por un lado, la apertura del canal GIRK dependiente de proteínas Gs (mediado por el receptor GABA B) y por otro un incremento directo en su conductancia por acción del MPD.

Bajo estas condiciones, la administración de A a concentraciones de 1,0 μ M y 1,5 μ M revierte la hiperpolarización mediada por GABA B – GIRK (Fig.31 A y B). Mientras

4. Resultados

que a concentraciones de $0,5 \mu\text{M}$ dicho efecto no fue tan evidente (Fig. 31 C). Se corrobora que esta hiperpolarización es dependiente de los canales GIRK, debido a que es igualmente revertida por la administración de tertiapin -Q (Fig. 31 D). Este resultado indica que el A afecta la respuesta mediada por los canales GIRK de una forma dosis dependiente.

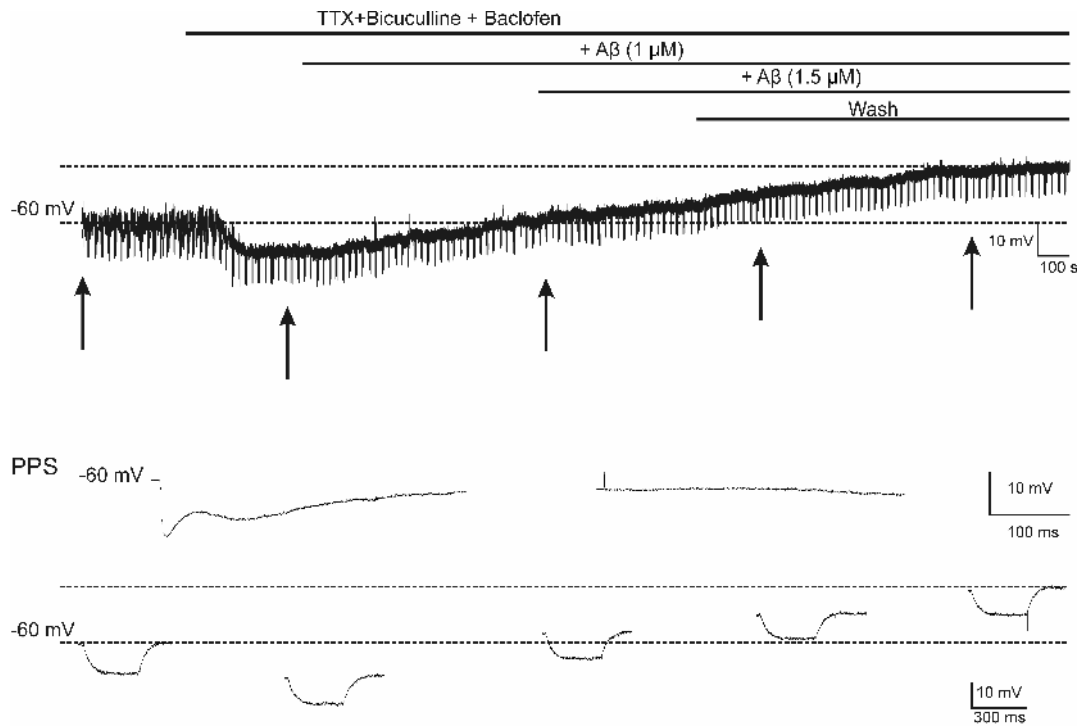


Fig. 30. Registro del potencial de membrana de una neurona piramidal de CA3 luego de la perfusión con TTX ($1\mu\text{M}$), Bicuculline ($10\mu\text{M}$) and Baclofen ($14\mu\text{M}$). Este tratamiento induce una hiperpolarización postsináptica dependiente de receptores GABA B. La perfusión con A ($1 \mu\text{M}$ y $1,5 \mu\text{M}$) revierte este efecto (parte superior de la gráfica). Nótese que el A induce una despolarización adicional al final del registro. En esta misma neurona, la estimulación de la fimbria induce un PIPS temprano y tardío, el cual es bloqueado por TTX (parte media de la gráfica). En la parte inferior, se muestra en detalle la respuesta a pulsos de corriente hiperpolarizante intracelular (flechas). Las variaciones en amplitud nos permite determinar la resistencia interna de la membrana (R_i) durante todo el registro y además comprobar la viabilidad de la preparación.

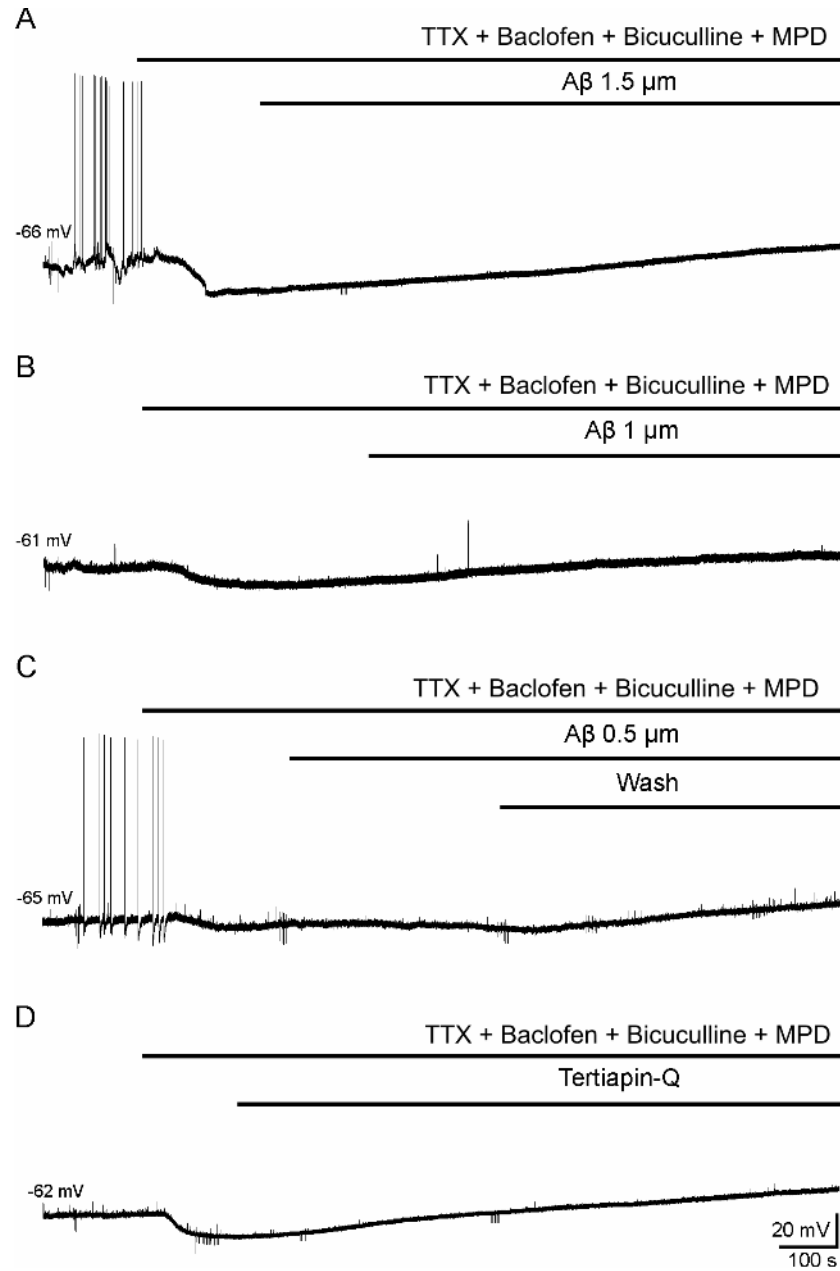


Fig. 31. Hiperpolarización postsináptica inducida por Baclofen , Bicuculina, TTX y MPD (agonista de los canales GIRK). A. Reducción de la respuesta postsináptica mediada por GIR K-GABAB tras la perfusión con A 1,5 uM. B. Bajo las mismas condiciones, la administración de A 1 μM reduce dicha respuesta. C. No se observan cambios significativos con la perfusión de A a 0,5 μM. D. La perfusión de Tertiapin-Q (antagonista selectivo de canales GIRK) revierte la hiperpolarización inducida por Baclofen y MPD. Notece que la pendiente de despolarización al final de cada registro es mayor conforme se incrementa la concentración de A.

5. DISCUSIÓN

El presente trabajo pretende dilucidar alguno de los mecanismos involucrados con el fenómeno de disfunción sináptica inducido por A. Igualmente, se enfoca en los efectos del A (25-35) sobre la respuesta sináptica inhibitoria mediada por GABA en la región CA3 del hipocampo, así como en sus acciones sobre las propiedades biofísicas de las neuronas piramidales. La región CA3 del hipocampo es considerada de gran importancia para el procesamiento de la memoria, dado que muchas de las sinapsis de los circuitos intra y extrahipocampales hacen contacto con las células principales de CA3 y que la actividad sináptica de esta región es importante para el procesamiento de la información (Amaral y Witter, 1989; Hasselmo et al., 2002).

En primer lugar, se ha caracterizado desde el punto de vista electrofisiológico mediante la técnica de fijación de corriente (registro intracelular en modalidad *current clamp*), diversos parámetros de membrana en las neuronas piramidales de la región CA3. Hemos encontrado dos tipos de neuronas piramidales con patrones típicos de disparo: espiga única y múltiple. Teniendo en cuenta que tanto las neuronas de espiga única como las neuronas de múltiples espigas son de tipo piramidal (según los resultados morfológicos), y dado que no presentan diferencias significativas en la mayoría de parámetros, se decidió agruparlas para experimentos posteriores. Tras la estimulación de la fimbria, se ha logrado caracterizar los diferentes tipos de receptores implicados en la respuesta sináptica mediante tres metodologías: con variaciones en la intensidad del estímulo (para determinar su origen mono o polisináptico); con modificaciones en el Vm (lo cual permitió determinar los posibles iones implicados en cada respuesta) y finalmente, con la aplicación de fármacos para la caracterización de los receptores implicados. Los resultados presentados demuestran que la respuesta sináptica en el complejo fimbria/CA3 incluye la activación de los receptores glutamatérgicos ionotrópicos y receptores para el GABA. Tras la caracterización de las propiedades intrínsecas de las neuronas piramidales y después de determinar la naturaleza de la respuesta sináptica, se procedió a evaluar los efectos de dosis crecientes de A (25-35) sobre cada parámetro. En términos generales, el A solamente afectó dos parámetros de las propiedades activas de las células piramidales: I) el patrón del potencial de acción y II) la posthiperpolarización. En cuanto a las propiedades pasivas, se observaron efectos sobre la resistencia de la membrana (R_i) y en el potencial de membrana (V_m). Hemos establecido una relación temporal entre los efectos sinápticos y los cambios en las propiedades pasivas de la membrana. El A modificó el componente generado por

activación del receptor GABA B, lo cual se corresponde con las variaciones en la resistencia de la membrana. Después de inducir la activación del receptor GABA B se confirmó que el A afecta dicha respuesta de una forma dosis y tiempo dependientes, y que además dicho efecto se puede corresponder con cambios en la conductancia del canal GIRK.

5.1. Caracterización Electrofisiológica y Morfológica de las Neuronas Piramidales en CA3

Estudios previos han descrito muchas de las propiedades activas y pasivas de las neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo, los cuales se corresponden con los valores registrados bajo nuestras condiciones experimentales (Spruston y Johnston, 1992; Wittner et al., 2007; Hemond et al., 2008; Hemond et al., 2009). Estudios “*in vitro*”, así como modelos computacionales han descrito diferentes patrones de disparo en las neuronas piramidales de CA3: neuronas piramidales de espiga simple (Spruston y Johnston, 1992); neuronas con múltiples potenciales de acción iniciales con descarga en ráfagas (Wittner et al., 2007); neuronas con descargas en trenes acompañados por un mecanismo de adaptación y finalmente, descargas de inicio retardado (Hemond et al., 2008). En el presente trabajo fueron registradas neuronas piramidales de espiga única y neuronas con múltiples potenciales de acción iniciales (de 2 a 4 espigas) acompañados por un mecanismo de adaptación (reducción en la frecuencia de disparo durante el pulso de corriente), ambos tipos fueron seguidos con posthiperpolarizaciones (AHP) características. Estudios morfo-funcionales previos, indican que las neuronas de CA3 localizadas proximales al giro dentado responden mayoritariamente con un solo potencial de acción, mientras que las que se encuentran más distales (es decir mas cerca de CA2) presentan una mayor tendencia a generar un patrón de tipo ráfagas (Masukawa et al., 1982). Igualmente, las neuronas cuyo soma se encuentra más cercano al *stratum oriens/pyramidale* tienden a generar potenciales en ráfagas en comparación con las neuronas cercanas al *stratum radiatum* (Bilkey y Schwartzkroin, 1990). Diferencias tanto morfológicas (en cuanto a la longitud inicial de su dendrita) como diferencias en la conductancia a múltiples iones (calcio, potasio y sodio principalmente) parecen explicar dichas diferencias (Bilkey y Schwartzkroin, 1990; Hemond et al., 2008). Con el fin de homogeneizar la muestra, se procuró realizar los registros en la región CA3b (zona intermedia de CA3) y en la zona central del *stratum pyramidale*, para así evitar diferencias marcadas en el tipo de neurona piramidal registrada. En algunos casos,

después de evaluar las características electrofisiológicas de las neuronas de espiga única y múltiples espigas, y tras la administración de un trazador intracelular (Biocitina), se pudo identificar que efectivamente corresponde con neuronas de tipo piramidal con un soma ubicado en el *stratum pyramidale* (Fig. 13). Estas neuronas piramidales de CA3 presentaron un extenso árbol dendrítico basal, el cual se distribuye en el *stratum oriens*, región donde finalizan muchas terminales axónicas (Wittner et al., 2007; Ito et al., 2000) incluidas terminales glutamatergicas asociativo/comisurales. En comparación con las neuronas piramidales de otras regiones, la resistencia de entrada de las neuronas de CA3 es ligeramente mayor (en nuestro caso $114 \pm 4,69 \text{ M}\Omega$), lo cual indica que su árbol dendrítico es eléctricamente compacto en condiciones basales (Andersen et al., 2007). Un valor de resistencia relativamente alto, indica que frente a una pequeña variación en la corriente de la membrana, los efectos sobre el potencial serán mayores.

Las neuronas registradas en este estudio presentaron un valor de potencial de membrana en reposo ($-73,225 \pm 0,883 \text{ mV}$), ligeramente mayor (en términos del valor absoluto) con respecto a otros estudios (Wittner et al., 2007; Spruston y Johnston, 1992) sin que estas variaciones impliquen un cambio significativo en otras propiedades de membrana. No se registraron diferencias significativas en muchos de los parámetros de membrana evaluados entre los dos tipos de neurona piramidal registrados. Sin embargo, se presentaron diferencias en cuanto a su nivel de potencial umbral (Tabla 2). Las neuronas de múltiples espigas, presentaron un potencial umbral menor con respecto a las neuronas de una sola espiga. En estas, fue necesario inyectar más corriente para generar un potencial de acción. Dicha diferencia se puede atribuir a discrepancias en cuanto a la sensibilidad de sus canales de sodio voltajes dependientes y diferencias en la permeabilidad a iones como el potasio y el calcio (Hemond et al., 2008). Estas diferencias pueden tener implicaciones en la susceptibilidad a la lesión o a los efectos del A β , lo cual será discutido más adelante.

Como se mencionó en la introducción, otros trabajos indican que las neuronas piramidales de CA3 presentan potenciales de membrana entre -60 a $-69 \pm 1 \text{ mV}$, con resistencias de membrana entre $81,6$ a $135 \text{ M}\Omega$ y con constantes de tiempo del orden de $66 \pm 4 \text{ ms}$, dependiendo del estudio (Spruston y Johnston, 1992; Wittner et al., 2007). Estos datos se corresponden con los registrados en el presente trabajo. En algunos casos fue necesario administrar corriente e hiperpolarizar ligeramente la neurona para mantener más estable el registro durante la aplicación del A β y los fármacos.

Tras la generación del potencial de acción, así como durante el registro de la actividad espontánea de las neuronas piramidales se pudieron identificar diferentes componentes de la posthiperpolarización: fAHP, mAHP, sAHP, así como una post despolarización (ADP). Los estudios realizados en neuronas de CA1 y CA3, han permitido identificar que los canales iónicos que participan en la AHP son en su mayoría canales de potasio dependientes de Ca^{2+} y voltaje (SK y BK) y canales tipo KCNQ, mientras que la ADP es dependiente de los canales de Ca^{2+} tipo R (Storm, 1990; Gu et al., 2005). Con respecto a dichos parámetros incluyendo la Ri y el Vm, no se encontraron diferencias significativas entre los dos tipos de neurona registrados.

5.2. Respuesta Sináptica Provocada en la Conexión Fimbria -CA3

Como se mencionó anteriormente, a través de la fimbria discurren fibras provenientes de la banda diagonal de Broca y del Septum medial, conformando lo que se denomina el sistema septo-hipocampal. Por esta vía discurren conexiones GABAérgicas hacia las interneuronas de CA3, fibras colinérgicas y proyecciones glutamatérgicas desde y hacia las neuronas piramidales de CA3 (Freund and Antal, 1988; Bennett et al., 1994; Ito et al., 2000; Widmer et al., 2006; Huh et al., 2010).

Existen pocos estudios sobre la actividad electrofisiológica de la sinápsis fimbria/CA3. En un estudio clásico (Schneiderman et al., 1992), se identificó mediante registro intracelular y de campo en CA3 dos componentes después de estimular el fornix: excitatorio e inhibitorio. Dichos componentes reflejaban la activación de receptores glutamatérgicos AMPA/Kainato (no NMDA) y Gabaérgicos tipo GABA A, ya que fueron bloqueados por CNQX y Bicuculina respectivamente. En nuestro estudio, después de estimular la fimbria se generó en las neuronas piramidales de CA3 una respuesta sináptica compleja compuesta por tres fases: un potencial excitatorio postsináptico seguido de dos potenciales inhibitorios, uno temprano y otro tardío. Dicho tipo de respuesta compleja ha sido descrita por otros autores en las neuronas piramidales del núcleo basolateral amigdalino, y en neuronas de CA3 luego de estimular el hilus (Washburn y Moises, 1992; Malouf et al., 1990).

En este estudio se han podido disecar farmacológicamente los tres componentes de la respuesta, comprobándose que la respuesta excitatoria es de naturaleza glutamatérgica de tipo ionotrópica (bloqueado totalmente por CNQX y APV), resultados en concordancia con datos recientes que describen dicha respuesta (Huh et al., 2010). En

cambio, la respuesta inhibitoria temprana se debió a la activación de receptores GABA A (bloqueada por bicuculina), mientras que la respuesta inhibitoria tardía es causada por activación de receptores GABA B (bloqueado por saclofen). Esta respuesta inhibitoria parece estar mediada por la activación de interneuronas gabaérgicas dependientes de la activación glutamatérgica, ya que el bloqueo de la respuesta excitatoria eliminó también el componente inhibitorio (la administración de los antagonistas glutamatérgicos bloquean los componentes inhibitorios) (Fig.20). En relación al componente tardío, la activación de los receptores GABA B dependen de la estimulación de un grupo grande de interneuronas GABAérgicas y de que a su vez liberen una cantidad suficiente de neurotransmisor para alcanzar los receptores GABA B extrasinápticos. Los estudios de Scanziani, (2000) señalan que la activación de una sola interneurona no es suficiente para activar los receptores GABA B.

Como puede observarse en la Fig. 20A, el bloqueo de los receptores GABA A se acompaña de un incremento significativo en el componente excitatorio glutamatérgico (efecto que no es tan evidente con el bloqueo del componente GABA B). El aumento del componente excitatorio por bloqueo de los receptores GABA A se debe principalmente a que la disminución en la conductancia al Cl^- en la membrana, disminuye el cortocircuito mediado por estos canales en estado de alta conductancia. Por otro lado, la función primaria de la activación del receptor GABA B, al parecer es regular la excitación sináptica recurrente principalmente por un mecanismo de hiperpolarización sostenida (Malouf et al., 1990; Hammond, 1996).

El hipocampo se encuentra implicado en los procesos de memoria y aprendizaje a través de su interacción con otras regiones del encéfalo, función que depende en gran medida de vías recíprocas a través del sistema fimbria/fornix y de su conexión con la región CA3 (García et al., 2008; Brito y Brito, 1990). El estudio de los efectos del A sobre dicha conexión es de gran importancia, ya que sus acciones podrían tener repercusiones sobre la actividad celular y el procesamiento de la información.

5.3. Efectos del Beta Amiloide (25-35) sobre las Propiedades de Membrana

En el presente estudio, el A modificó el potencial de membrana, la R_i , la posthiperpolarización y el patrón de disparo neuronal, propiedades dependientes fundamentalmente de la conductancia al K^+ y al Ca^{2+} . Existe un gran número de trabajos que indican que el A afecta el balance iónico a través de su interacción con

receptores de membrana acoplados a canales iónicos, o por efectos directos sobre la conductancia de los canales, y/o por su interacción con la bicapa lipídica (Furukawa et al., 1994; Fraser et al., 1997; Matsuzaki, 2007). Igualmente, se ha descrito que el A puede generar canales catiónicos directamente en la membrana, provocando consecuentemente neurotoxicidad (Pollard et al., 1993). Nosotros hemos evaluado algunos de los efectos del A sobre estas propiedades.

5.3.1. Propiedades Pasivas

5.3.1.1. Efectos del Beta Amiloide (25-35) sobre la Resistencia Interna de la Membrana (Ri)

Bajo nuestras condiciones experimentales, el A (25-35) produjo un incremento en la resistencia de entrada (Ri) a concentraciones de 1,0 μ M y 1,5 μ M, sin evidenciarse un cambio significativo a concentraciones de 0,5 μ M (Fig 24). Este incremento en la resistencia, se asocia a una reducción de la conductancia de la membrana y por lo tanto al cierre de canales iónicos.

Estos resultados contrastan con estudios en neuronas piramidales de la corteza de ratón, en el cual la administración del péptido A 1-42 (ratón) y 25-35 (rata) (forma oligomérica/fibrilar) no modificaron significativamente los niveles de resistencia interna después de 1 hora de incubación (Minkeviciene et al., 2009). Por otro lado, en neuronas del giro dentado se ha registrado un pequeño incremento de la Ri tras la perfusión con A 1-42, sin que este incremento resulte estadísticamente significativo (Yun et al., 2006). Las diferencias en el tipo de péptido utilizado (en nuestro caso, el péptido es de origen humano) y el tipo de neurona estudiada podrían explicar estas diferencias. Estudios realizados en nuestro laboratorio, señalan que el A (25-35) podía incrementar o reducir la Ri en las neuronas de la amígdala basolateral. En dicha situación, ese efecto fue bloqueado por TTX y por lo tanto indica su dependencia de factores trans-sinápticos (Ashenafi et al., 2005).

Estas discrepancias podrían ser explicadas por las diferentes estructuras registradas y por la diferencia en cuanto al análisis y tratamiento de datos aplicados. El presente análisis se basa en el estudio de las modificaciones generadas por el A con respecto a valores normalizados de Ri para cada neurona y no sobre valores absolutos. En nuestro caso la administración de TTX, no fue capaz de evitar los efectos del A sobre la Ri (Fig. 24 C2 y Fig. 29 B), indicando que en el caso de las neuronas piramidales de CA3 este efecto puede tener un origen postsináptico.

5.3.1.2. Efectos del Beta Amiloide (25-35) sobre el Potencial de Membrana (Vm)

En términos generales, las neuronas piramidales de CA3 expuestas a dosis crecientes de A respondieron con una despolarización de la membrana dependiendo de la concentración y del tiempo de exposición al A (25-35) (Fig. 21). Dichos efectos fueron registrados directamente, o inferidos mediante la inyección de corriente hiperpolarizante. Dependiendo del protocolo en algunos casos y con el fin de mantener el potencial de membrana constante, fue necesario inyectar DC hiperpolarizante tras la administración del A a concentraciones de 1 μ M y 1,5 μ M.

La despolarización de la membrana inducida por A fue registrada en condiciones de perfusión con TTX (Fig. 30) y a valores de Vm de -70 ± 5 mV, lo cual indica que los efectos del A sobre el potencial de membrana tiene un origen postsináptico y no dependiente de canales de sodio voltaje dependientes. En nuestras condiciones experimentales, las concentraciones de A de 1,5 μ M generaron una despolarización irreversible de la membrana, que no recupera su valor de potencial después de varios minutos de lavado con solución de Krebs. Dicho efecto neurotóxico ha sido descrito previamente a concentraciones superiores de 1,2 μ M en amígdala basolateral (Ashenafi et al., 2005).

En ratones transgénicos (modificados para producir importantes cantidades de A), se ha registrado el mismo fenómeno de despolarización progresiva (en ese caso de hasta 12 mV) en neuronas de la corteza y giro dentado. La disminución en el Vm produce un incremento en la excitabilidad y apertura de los canales tipo NMDA lo cual, a largo plazo, puede afectar la función neuronal e inducir neurotoxicidad mediada por Ca^{2+} (Minkeviciene et al., 2009).

Por otra parte, el hecho de que tanto los antagonistas de receptores metabotrópicos de glutamato, como la inactivación de las proteínas G por medio de la toxina pertusis, reduzcan el fenómeno de despolarización inducida por A 1-42, ha llevado a postular que dicho efecto puede tener un mecanismo dependiente de proteínas G y de los receptores mGluR1 y mGluR2 (Blanchard et al., 2002a y 2002b). Aparentemente la activación o inactivación de ciertos canales iónicos dependientes de proteínas G (incluidos los canales GIRK), podría explicar este efecto (Inanobe et al., 2001, Leaney et al., 2001; Ikeda et al., 1995b).

Por otro lado, los inhibidores de tirosina kinasa y algunos antagonistas de canales de cloro, son capaces de inhibir la despolarización inducida por A 1-42, y se postula

como parte de la cascada asociada a los receptores metabotrópicos de glutamato (Blanchard et al., 2002a).

5.3.2. Propiedades Activas

5.3.2.1. Efectos del Beta Amiloide (25-35) sobre el Potencial de Acción y la AHP

El A no generó cambios en la amplitud del potencial de acción, ni tampoco produjo cambios significativos con respecto a muchos de los parámetros de membrana asociados al potencial de acción, tales como la AHP rápida y lenta, ni tampoco en la ADP (Tabla 3). Teniendo en cuenta que tanto fAHP y sAHP dependen de canales de potasio dependientes de calcio (tipo BK y SK), y que la ADP depende de canales de calcio tipo R (Storm, 1990; Metz et al., 2005), nuestros resultados sugieren que el A (25-35) no afecta la permeabilidad de dichos canales. Igualmente, teniendo en cuenta que no observamos modificaciones en la amplitud del potencial de acción, consideramos que el A no afecta aquellos canales de sodio y potasio voltaje dependientes encargados de la generación del potencial de acción. Estudios previos tampoco han encontrado modificaciones del A sobre la amplitud, duración, ni en el tiempo de despolarización de los potenciales de acción inducidos, ni en los espontáneos tanto en neuronas de amígdala como en corteza (Ashenafi et al., 2005; Wang et al., 2009).

Nuestros resultados muestran un incremento inducido por concentraciones intermedias de A (1,0 μ M) sobre la amplitud de la AHP media (Fig. 22). Estudios realizados con oligómeros de A 1-42, han encontrado un incremento similar sobre la mAHP de las neuronas del giro dentado, y sugieren un incremento en la permeabilidad al potasio (Yun et al., 2006). La mAHP depende de los canales KCNQ principalmente (corriente M-IM) y de los canales de potasio activados por calcio y voltaje tipo BK (corriente tipo IC) (Storm, 1990; Gu et al., 2005). Teniendo en cuenta que la IM es atenuada por agonistas colinérgicos (carbacol) (Brown y Constanti, 1980; Storm et al., 1990), efecto igualmente descrito para la mAHP de las interneuronas de CA3 (Savi et al., 2001), es posible que este incremento en la mAHP, sea producto de una alteración en la actividad colinérgica inducida por A. Hay múltiples estudios que indican que el A reduce la síntesis y la liberación de acetilcolina en el hipocampo (Davies y Maloney, 1976; Selkoe, 2002; Nyakas et al., 2011; Schliebs y Arendt, 2011). Sin embargo, estudios recientes indican que el A (25-35 y 1-40) puede reducir la conductancia de los canales KCNQ (Leão et al., 2011; Sanabria et al., 2011 datos no publicados), por lo cual el

mecanismo de dicho incremento podría igualmente incluir una mayor conductancia de los canales tipo BK.

En términos generales, la AHP tiene la función de regular la excitabilidad neuronal limitando el número de potenciales de acción e impidiendo el continuo disparo de la célula después de una ráfaga de potenciales de acción (Brown y Constanti, 1980; Madison y Nicoll, 1984;; Storm et al., 1990), por lo tanto este efecto puede tener implicaciones en términos de la excitabilidad neuronal en las neuronas piramidales de CA3.

5.3.2.2. Efectos del Beta Amiloide (25 -35) sobre el Patrón de Disparo

El A (25-35) produjo efectos duales en la excitabilidad neuronal y el patrón de disparo dependiendo del tipo de neurona registrada. Sin embargo, dichos efectos no fueron evidentes en todas las neuronas, indicando una susceptibilidad variable a los efectos del A en cuanto su excitabilidad.

En el caso de las neuronas de tipo espiga simple, el A a concentraciones de 1,0 μ M y 1,5 μ M produjo un incremento en el número de potenciales de acción luego de un pulso de corriente despolarizante. Dicho efecto se generó con una menor cantidad de corriente necesaria para superar el umbral (Fig. 23A). En un estudio previo se indica que el A (25-35) puede incrementar la excitabilidad de las neuronas de corteza y generar descargas epileptiformes (Minkeviciene et al., 2009). En dicho estudio, el efecto es consecuencia de una despolarización progresiva de la membrana, sin postular que mecanismo en concreto media esta despolarización.

Una posible explicación, sería considerar los efectos del A sobre la conductancia para el potasio. Se ha descrito que un incremento en los niveles de potasio extracelular y/o el bloqueo de diferentes conductancias para el potasio, hace que las células que descargan con una sola espiga, generen múltiples potenciales de acción frente a la misma cantidad de corriente despolarizante inyectada (Hemond et al., 2008). Hay evidencia de que el A cierra ciertos canales de potasio (Peña et al., 2006; Leão et al., 2011), lo cual podría generar un menor umbral, por lo tanto una mayor excitabilidad y un aumento en la Ri.

Por el contrario, en las neuronas que disparan con múltiples espigas se observó una reducción en el número de potenciales de acción tras la perfusión con A. Además, fue necesaria una mayor inyección de corriente para generar dichos potenciales (Fig. 23B). La reducción en la excitabilidad inducida por A ha sido descrita en giro dentado (Yun et al., 2006), y se ha postulado como mecanismo un incremento en la conductancia para

el potasio. Algunos estudios han señalado que el A puede aumentar la permeabilidad de canales de potasio voltaje dependientes y diferentes corrientes mediadas por potasio (Angulo et al., 2004; Peña et al., 2006).

Existe una relación entre la AHP, la excitabilidad celular y el patrón de disparo neuronal. La AHP puede modular negativamente la excitabilidad de las neuronas piramidales del hipocampo, y además limitar la frecuencia de disparo en otro tipo de neuronas (Gorelova y Reiner, 1996; Podlogar y Dietrich, 2006; Hemond et al., 2008). En un reciente estudio, el A 1-42 afectó la AHP y el potencial umbral dependiendo de la concentración: bajas concentraciones aumentan el umbral e incrementan la AHP, haciendo que las neuronas sean menos excitables; mientras que altas concentraciones, reducen el potencial umbral y reducen la AHP con lo cual las neuronas de la corteza prefrontal se hacen más excitables (Wang et al., 2009b).

Aparentemente, las diferencias en cuanto a la conductancia y expresión de ciertos canales iónicos entre los diferentes tipos de neuronas, hacen que la susceptibilidad al A pueda ser diferente. Esta hipótesis se basa en modelos computacionales, donde se sostiene que las conductancias relativas a diferentes canales del potasio (principalmente IC, IM e ID) contribuye a las diferencias en cuanto al patrón de disparo observado experimentalmente (Hemond et al., 2008). Por lo tanto, es factible que las neuronas que disparan con una espiga simple posean una mayor susceptibilidad a los efectos del A, a diferencia de las neuronas con espigas múltiples y además, las diferencias en la conductancia al Ion potasio entre tipos neuronales, podría igualmente explicar las diferencias en los efectos del A sobre la membrana.

5.4. Efectos del Beta Amiloide (25-35) sobre la Respuesta Sináptica Provocada Fimbria-CA3

Estudios previos indican que el péptido A afecta los sistemas de neurotransmisión en la vía septohipocampal y, por lo tanto, a la respuesta glutamatérgica y colinérgica de las neuronas del hipocampo. Dicho efecto es acompañado por alteraciones en la generación del ritmo theta (Yamaguchi and Kawashima, 2001; Colom et al., 2010). Teniendo en cuenta que el ritmo theta también depende de la actividad GABAérgica (Simon et al., 2006), es asumible un efecto del A sobre dicho sistema de neurotransmisión. Hasta la fecha no se han publicado datos en relación a los efectos del A sobre la respuesta sináptica compleja fimbria/CA3. La posibilidad de estudiar en una misma preparación una respuesta polisináptica que incluye la actividad excitatoria e inhibitoria, hacen que

el estudio de la sinapsis fimbria/CA3 sea un gran modelo para entender los mecanismos implicados en el proceso de disfunción sináptica generado por el BA.

En el presente trabajo se registraron los efectos de concentraciones progresivas de A (25-35) sobre la amplitud de los diferentes componentes excitatorio e inhibitorios de la respuesta sináptica compleja, en neuronas piramidales de CA3 tras estimular la fimbria de forma repetida y a lo largo del tiempo.

5.4.1. Respuesta Sináptica Excitatoria

La administración del A (25-35) a una concentración de 1,5 μ M, generó un incremento significativo en el componente excitatorio postsináptico (PEPS) generado por la estimulación de la sinapsis fimbria/CA3. Estos efectos fueron acompañados por un incremento en la Ri (teniendo en cuenta una correlación positiva para ambos factores) (Fig. 26 y 27) y de despolarización irreversible de la membrana. La caracterización farmacológica de la actividad sináptica indica que dicha respuesta excitatoria es dependiente de los receptores ionotrópicos AMPA/NMDA (Fig. 20) y, por lo tanto, se infiere un efecto del A sobre dicha actividad glutamatérgica. Estudios previos indican que una alta dosis de A se asocia a mecanismos de neurotoxicidad mediada por glutamato y por Ca^{2+} , la cual se acompaña de una despolarización irreversible (Molnar et al., 2004; Calabrese et al., 2007; Cowburn et al., 1997). Sin embargo, hay que aclarar que los PEPS en el contexto de una respuesta sináptica compleja son igualmente sensibles a las modificaciones en la respuesta postsináptica inhibitoria.

Estudios preliminares realizados bajo nuestras condiciones experimentales (Navarro - Lopez et al., 2010) indican que el A (25-35) tiene un efecto postsináptico sobre la respuesta excitatoria glutamatérgica en la sinapsis fimbria/CA3. Luego de un protocolo por pulsos pareados, se observó que el A no afectó la relación S2/S1. Sin embargo, la mayoría de nuestras respuestas sinápticas incluye al menos un componente inhibitorio, por lo cual dicho protocolo resultó difícil de aplicar.

En concordancia con estos resultados, hay estudios que indican que el A puede interactuar directamente con los receptores AMPA/NMDA y afectar su conductancia de manera diferencial. Hay evidencia de que el A puede incrementar la conductancia iónica para el receptor NMDA (Molnar et al., 2004) y por otro lado disminuir la de AMPA (Parameshwaran et al., 2007) en diferentes modelos. Sin embargo, en estos estudios no se tiene en cuenta factores como concentración y tiempo de exposición del

péptido BA, ni tampoco se puede excluir del todo los efectos presinápticos y de excitotoxicidad inducida por A (Butterfield et al., 2007; Calabrese et al., 2007). La activación de los receptores NMDA por el A y el subsecuente influjo de Ca^{2+} intracelular parecen ser importantes también para explicar los procesos de neurodegeneración y eventualmente para la despolarización de la membrana (Cowburn et al., 1997; Blanchard et al., 2002a). Por otro lado, hay evidencia de que el A puede afectar el potencial de membrana de los astrocitos, inhibiendo a su vez la recaptación extracelular de glutamato y aumentando su disponibilidad en la hendidura sináptica (Harkany et al., 2000).

5.4.2. Respuesta Sináptica Inhibitoria: PIPS temprano y PIPS tardío

En el presente trabajo, hemos descrito una reducción del componente inhibitorio tardío (PIPS tardío) inducido por la perfusión de A (25-35) a concentraciones de 1,0 μM y 1,5 μM (Fig. 25). El PIPS tardío es generado por la activación de los receptores GABA B, por lo tanto se deduce un efecto del A sobre los receptores GABA B, o su mecanismo de señalización intracelular o su efector final, los canales GIRK. Teniendo en cuenta, que el componente PIPS temprano generado por el receptor GABA A no fue afectado durante la perfusión con A a concentraciones crecientes, consideramos que la reducción en el componente GABA B no depende de una inhibición de la liberación del GABA ni de otros mecanismos presinápticos. Dicha reducción en la amplitud, se acompaña de un incremento en la resistencia de la membrana, lo que podría sugerir una alteración en la conductancia de los canales de potasio acoplados al receptor GABAB. Hasta el momento, no se han descrito efectos del A (25-35) sobre la actividad funcional de los receptores GABA B, ni sobre su efector el canal GIRK a nivel de las neuronas piramidales del hipocampo. Igualmente, hay muy pocos estudios sobre los efectos funcionales del A sobre la actividad inhibitoria del hipocampo y concretamente sobre la sinapsis fimbria/CA3.

Estudios de unión y competición (*binding*) mediante autorradiografía para receptores GABA A y GABA B en sujetos postmortem con diagnóstico de Enfermedad de Alzheimer, indican una reducción en la densidad de dichos receptores a nivel del giro frontal superior (Chu et al., 1987a), a nivel del giro dentado y a nivel del hipocampo (Chu et al., 1987b). Por otro lado, en un reciente estudio con tejido cerebral de sujetos con E. Alzheimer, se ha descrito un tipo de polimerasa, denominada 17A, encargada de generar “*splicing*” alternativo a nivel del receptor GABAB B2, esta modificación afecta

su mecanismo de señalización intracelular y la activación de los canales GIRK; dicha polimerasa también se asocia a un incremento en la secreción del A. En dicho estudio se sugiere que puede existir una relación entre el metabolismo de la proteína APP (proteína precursora del amiloide) y la disfunción en la señalización del receptor GABA B (Massone et al., 2011).

5.7. Posible Mecanismo de Acción del Beta Amiloide (25-35) sobre la Actividad Inhibitoria Postsináptica

Para determinar si el A afecta la respuesta inhibitoria tardía por medio de un mecanismo postsináptico específico, se procedió a activar los receptores GABA B por medio de Baclofen (agonista de los receptores GABA B). De esta manera, la respuesta postsináptica hiperpolarizante mediada por los receptores GABA B fue bloqueada por A a dosis crecientes (Fig. 30). Se observó el mismo efecto cuando se perfundió la preparación con un agonista de los canales GIRK (MPD) más TTX (Fig. 31), lo cual indica que dicho efecto no tiene un origen presináptico y que es específico de la vía del receptor GABA B y su efector. Dicho resultado indica efectivamente que el A se comporta como un antagonista selectivo de la respuesta de la membrana acoplada a los receptores GABA B a nivel postsináptico. Además, teniendo en cuenta que tanto la despolarización como el incremento en la R_i se correlacionan con la reducción en el componente sináptico GABA B (ambos efectos son descritos a partir de una concentración de A de 1,0 μ M), y que dichos parámetros son modificados por el A incluso en presencia de TTX, sustentan el origen postsináptico del efecto observado. En nuestro sistema experimental, cuando se estimula la fimbria y por ende, las interneuronas GABAérgicas activan a los receptores GABA B de las células piramidales, en ese momento el A se comporta como un antagonista selectivo postsináptico de los efectos mediados por dicho receptor. Sin embargo, el sistema GABA B tiene una actividad tónica muy baja en condiciones basales y únicamente cuando el sistema es activado (mediante estímulo aferente o por agonistas), la perfusión con un antagonista hacen visibles sus efectos (Emri et al., 1996; Bowery, 2006). Por ejemplo, la administración de un antagonista GABA B produce hiperalgesia en sujetos con dolor crónico. Sin embargo, en sujetos sin dolor si se administra el antagonista no se produce dolor como efecto adverso (Malcangio y Bowery, 1994). La escasa actividad basal del sistema, hace que el bloqueo de los receptores GABA B tenga escaso efecto

sobre las propiedades de membrana en estado basal (por ejemplo sobre el potencial de membrana) (Lambert et al., 1989; Emri et al., 1996).

El antagonismo del receptor GABA B no explica el incremento de la R_i ni la despolarización de la membrana inducido por A (mecanismo a su vez relacionado con la reducción del PIPS tardío), ya que tampoco el bloqueo del receptor GABAB en condiciones fisiológicas basales por medio de saclofen es capaz de generar un incremento significativo de la resistencia de la membrana, ni tampoco genera despolarización. Este efecto ha sido igualmente descrito con otros antagonistas específicos de receptores GABA B y en otro tipo de neuronas (Lambert et al., 1989; Emri et al., 1996).

Por lo tanto, los efectos del A sobre la membrana deben incluir una reducción en la conductancia de los canales GIRK acoplados al receptor GABA B. Los canales GIRK presentan actividad tónica basal incluso sin la señalización del receptor, debido a su unión directa con la subunidad G de las proteínas G (Luján et al., 2009). De esta manera, la administración del antagonista de los canales GIRK (tertiapin Q) simula muchos de los efectos del A sobre la membrana: bloqueo del componente inhibitorio tardío, incremento en la resistencia de la membrana y despolarización de la membrana. Por otro lado, dichos efectos mediados por el antagonista tertiapin Q indican efectivamente que los canales GIRK se expresan en neuronas piramidales de CA3 y que además se encuentran funcionales en estado basal. La interacción entre el A y los canales GIRK en estado basal, es igualmente demostrable por el hecho de que luego de cerrar los canales GIRK por medio de la perfusión con tertiapin-Q y generar un incremento en la resistencia de la membrana (efecto que es saturable luego de un largo tiempo de perfusión), el A es incapaz de generar un incremento significativo adicional sobre los niveles de R_i relativos al control (Fig. 29D).

En nuestro caso, el mecanismo exacto por el cual el A genera una reducción en la conductancia de GIRK no ha sido completamente dilucidado. Estudios previos con RT-PCR indican que el A (25-35) puede reducir la expresión de los canales GIRK en el hipocampo (Tong y Wang, 2001), aunque dichos efectos son registrados con un tiempo muy prolongado de perfusión. Por otro lado, teniendo en cuenta que en el fenómeno de despolarización inducido por A se ha implicado al receptor metabotrópico de glutamato (Blanchard et al., 2002a, 2002b), y que dicho receptor reduce la corriente mediada por GIRK a su vez inducida por baclofen (Sohn et al., 2007), no se descarta un

mecanismo mediado por proteínas Gs. Por último, teniendo en cuenta la interacción directa y específica que tiene el A sobre la conductancia de diversos canales de potasio en particular (Fraser et al., 1997; Peña et al., 2006), no se puede descartar una interacción directa del A con alguna de las subunidades del canal GIRK de tal manera que afecte su conductancia.

Otro aspecto a tener en cuenta, es el hecho de que tanto los receptores GABA B como los canales GIRK se encuentran acoplados y co-expresados en la membrana postsináptica de las neuronas piramidales de CA3 (Drake et al., 1997; Kulik et al., 2003 y 2006; Lujan et al., 2009), además de que ambas proteínas forman un complejo molecular estable en la membrana plasmática en forma oligomérica (Ciruela et al., 2010). Según los resultados anteriormente presentados, es factible que los efectos del A sobre la membrana y la respuesta sináptica incluyan una alteración de ambos componentes, aunque nuestros resultados indican que este efecto se debe a una alteración principalmente en la actividad del canal GIRK.

La reducción en la actividad del canal GIRK puede tener múltiples implicaciones sobre la actividad sináptica y la función neuronal. Los receptores GABA B presinápticos regulan la liberación de muchos neurotransmisores, entre ellos el glutamato y el GABA. El papel de los canales GIRK sobre estos efectos presinápticos es controvertido, y mientras algunos indican que los efectos son predominantemente postsinápticos en el hipocampo (Lüscher et al., 1997), estudios más recientes indican efectos sobre la liberación del glutamato en corteza (Ladera et al., 2008). En nuestro caso los efectos del

A sobre los canales GIRK indican un efecto postsináptico, ya que no hemos observado un incremento significativo en la amplitud del componente GABA A que indique aumento en la liberación de dicho neurotransmisor inducido por A (25-35). Una posible explicación a este resultado, tiene que ver con el hecho de que los receptores GABA B presinápticos en el hipocampo se expresan principalmente en terminales glutamatérgicas antes que en GABAérgicas (Kulik et al., 2003). Es posible que la alteración en la conductancia de los canales GIRK presinápticos inducido por A, pueda explicar el fenómeno de excitotoxicidad por glutamato aunque se necesitarían más estudios para confirmarlo.

Por otro lado, estudios con deleciones en los canales GIRK han permitido revelar su papel en los procesos de aprendizaje y memoria. Sujetos con mutaciones en los canales GIRK 4, presentan un deterioro en la ejecución del laberinto acuático de Morris sin alteraciones en otros paradigmas de aprendizaje. Dicho laberinto, es utilizado para

evaluar el aprendizaje y la memoria espacial, los cuales son procesos cognitivos muy dependientes de la actividad del hipocampo (Wickman et al., 2000). Además, en otros modelos animales con alteraciones en la expresión de GIRK 2, se observa una reducción en la LTP e incremento de LTD a nivel del hipocampo (Sago et al., 1998; Siarey et al., 1999; Lüscher y Slesinger, 2010) lo cual sugiere alteraciones en la plasticidad sináptica. Como ya se sabe, la LTP es un mecanismo de plasticidad neuronal que se relaciona con la memoria. De esta manera, la reducción en la actividad de los canales GIRK inducida a su vez por un exceso de A, podrían generar una alteración en los mecanismos de plasticidad sináptica en el hipocampo y por lo tanto explicar bajo este mecanismo las alteraciones memorísticas vistas en el déficit cognitivo leve y en formas tempranas de la EA.

Múltiples estudios resaltan el papel de los canales GIRK en diferentes respuestas fisiológicas, así como en la excitabilidad neuronal y la muerte celular. Así mismo, hay una relación entre las alteraciones en el funcionamiento normal del canal GIRK con diversos procesos patológicos en el sistema nervioso (epilepsia, dolor, adicción y E. Parkinson, entre muchos otros) (Lüscher y Slesinger, 2010). El presente estudio es el primero que revela un efecto del A (25-35) sobre el funcionamiento de los canales GIRK, y por lo tanto pretende ser una base para entender las alteraciones cognitivas vistas en los estadios tempranos de la enfermedad de Alzheimer. Una alteración en la actividad de los canales GIRK inducido por A sobre las conexiones aferentes provenientes desde la fimbria sobre las neuronas principales del hipocampo, así como en la actividad GABAérgica de las interneuronas adyacentes y de las neuronas piramidales de CA3, podrían generar un desbalance en la actividad excitatoria e inhibitoria a nivel del sistema septo-hipocampal y así alterar la generación del ritmo theta necesario para el procesamiento de la información y para el almacenamiento de la memoria.

Se espera en el futuro que la modulación de los canales GIRK por medio de agonistas específicos (todavía no desarrollados), pueda ser una herramienta útil para el manejo de muchas patologías de origen neurológico. Con el presente trabajo, se abre la posibilidad de tener una nueva diana terapéutica que nos permita entender parte de la fisiopatología del déficit cognitivo leve o la EA en sus estadios más precoces, y así desarrollar nuevas estrategias terapéuticas que permitan atenuar dichos déficits.

5. RESUMEN Y CONCLUSIONES

El presente trabajo de investigación, se centró en estudiar los efectos del A (25-35) sobre la actividad sináptica y las propiedades biofísicas de las neuronas de la región CA3 del hipocampo, caracterizadas previamente. A continuación se presenta un resumen de los resultados más importantes, así como las conclusiones derivadas de dicho trabajo:

1. Por medio del registro intracelular en células piramidales de la región CA3 del hipocampo, se pudo identificar dos tipos de neuronas con patrones de disparo diferentes. Tras la inyección de pulsos de corriente despolarizante, se identificó un primer grupo de neuronas que generaban un solo potencial de acción (neuronas de espiga simple), independiente de la cantidad de corriente inyectada. Igualmente, se encontró un segundo tipo de células caracterizado por múltiples potenciales de acción al inicio del pulso. Este último grupo de neuronas presentó un umbral significativamente menor con respecto a las células de espiga simple y además incrementa el número de potenciales de acción conforme se incrementa la amplitud del pulso. Ambos tipos de células presentan una morfología piramidal, y no presentan diferencias significativas en las otras propiedades de membrana estudiadas. El registro en la región CA3b permitió obtener una muestra homogénea de neuronas para su posterior estudio.
2. Después del estímulo de la fimbria, se registraron respuestas tanto excitatorias como inhibitorias postsinápticas dependientes de glutamato y GABA. La respuesta sináptica compleja estaba compuesta por tres componentes: un primer componente excitatorio dependiente de la activación de receptores AMPA/NMDA; un componente inhibitorio temprano (de corta latencia) dependiente de la activación de receptores GABA A y un componente inhibitorio más tardío (de larga latencia y duración) dependiente de la activación de los receptores GABA B. La respuesta sináptica inhibitoria GABA A y GABA B fue a su vez dependiente de la activación glutamatérgica, lo que sugiere una mediación a través de interneuronas en CA3.
3. La perfusión con A (25-35) generó: i) despolarización progresiva de la membrana dependiente de la concentración de A; ii) incremento de la resistencia interna de la membrana (efecto registrado a concentraciones de 1,0 μM y 1,5 μM). iii) incremento de la mAHP. No encontramos efectos sobre otras

propiedades de membrana. Estos efectos indican una interacción del A sobre la membrana postsináptica y sobre la conductancia.

4. Dependiendo del tipo de neurona, los efectos del A fueron diferenciales. En el grupo de neuronas de espiga simple, el A produjo un incremento en el número de potenciales de acción acompañado por una disminución en el umbral, lo cual se traduce en una mayor excitabilidad. En las neuronas de múltiples espigas, el A generó una reducción en el número de potenciales de acción, y un aumento en su potencial umbral, es decir una menor excitabilidad. Este hallazgo supone diferencias en la susceptibilidad neuronal al A dependiendo del tipo de neuronal.
5. Tras estimular la fimbria y generar una respuesta sináptica compleja, el A (25-35) generó una reducción en el componente sináptico inhibitorio tardío a concentraciones de 1,0 μM y 1,5 μM , lo cual implica un efecto sobre la respuesta dependiente del receptor GABA B. No se observaron modificaciones en el componente GABA A a estas concentraciones. Estos datos sugieren un efecto específico postsináptico del A sobre el sistema GABA B.
6. La reducción en el componente GABA B se correlaciona de forma significativa con un incremento en la resistencia de la membrana. Así mismo, el bloqueo farmacológico del receptor GABA B ó del canal GIRK previene el incremento adicional de la R_i inducido por A. Por otro lado, la perfusión con TTX no previene los efectos del A sobre la R_i , lo cual indica que es un efecto postsináptico. Todos estos resultados sugieren que el mecanismo que explica el incremento en la R_i , se relaciona con una menor conductancia de los canales GIRK acoplados al receptor GABA B.
7. La hiperpolarización postsináptica de la membrana mediante la administración de un agonista del receptor GABA B y del canal GIRK, fue revertida por dosis crecientes de A, lo cual confirma un bloqueo selectivo de los efectos postsinápticos mediados por GABA B.

Teniendo en cuenta estos resultados, es posible concluir que el A afecta las propiedades intrínsecas de las neuronas, por medio de un bloqueo selectivo de canales iónicos particulares. Los efectos del A son específicos y dependen del tipo celular. En términos de la respuesta sináptica, este es el primer estudio que indica que el A (25-35) puede generar una disfunción en la sinápsis fimbria/CA3 por medio de un bloqueo de

los canales GIRK acoplados al receptor GABA B. Estos efectos son predominantemente de origen postsináptico y son dependientes de la dosis y del tiempo de exposición al A, sugiriendo la participación de este tipo de canales en la fisiopatología de la EA en sus fases más precoces, es decir antes de que se genere un proceso de neurodegeneración.

7. BIBLIOGRAFÍA

Abe E, Casamenti F, Giovannelli L, Scali C, Pepeu G. Administration of amyloid beta-peptides into the medial septum of rats decreases acetylcholine release from hippocampus in vivo. *Brain Res.* 1994 Feb 4;636(1):162-4.

Acsády L, Kamondi A, Sík A, Freund T, Buzsáki G. GABAergic cells are the major postsynaptic targets of mossy fibers in the rat hippocampus. *J Neurosci.* 1998 May 1;18(9):3386-403.

Aguado-Aguilar, L. Aprendizaje y Memoria. Simposio de Neuropsicología Básica. *Rev Neurol.* 2001; 32 (4): 373-381.

Ahmed OJ, Mehta MR. The hippocampal rate code: anatomy, physiology and theory. *Trends Neurosci.* 2009 Jun;32(6):329-38. Epub 2009 May 4. Review.

Almaguer-Melian W, Rosillo JC, Frey JU, Bergado JA. Subcortical deafferentation impairs behavioral reinforcement of long-term potentiation in the dentate gyrus of freely moving rats. *Neuroscience.* 2006;138(4):1083-8. Epub 2006 Jan 19

Alvarez A, Toro R, Cáceres A, Maccioni RB. Inhibition of tau phosphorylating protein kinase cdk5 prevents beta-amyloid-induced neuronal death. *FEBS Lett.* 1999 Oct 15;459(3):421-6.

Amaral DG. A Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. *J Comp Neurol.* 1978 Dec 15;182(4 Pt 2):851-914.

Amaral DG, Insausti R, Cowan WM. The commissural connections of the monkey hippocampal formation. *J Comp Neurol.* 1984 Apr 10;224(3):307-36.

Amaral DG, Kurz J. An analysis of the origins of the cholinergic and noncholinergic septal projections to the hippocampal formation of the rat. *J Comp Neurol.* 1985 Oct 1;240(1):37-59.

Amaral DG, Witter MP. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience.* 1989;31(3):571-91. Review

Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J. *The Hippocampus Book.* Oxford University Press, Inc. New York. 2007.

Andersen P. Interhippocampal impulses. II. Apical dendritic activation of CA1 neurons. *Acta Physiol Scand.* 1960 Mar 18;48:178-208.

Andrade R, Nicoll RA. Pharmacologically distinct actions of serotonin on single pyramidal neurones of the rat hippocampus recorded in vitro. *J Physiol.* 1987 Dec;394:99-124.

Angulo E, Noé V, Casadó V, Mallol J, Gomez-Isla T, Lluís C, Ferrer I, Ciudad CJ, Franco R. Up-regulation of the Kv3.4 potassium channel subunit in early stages of Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 2004 Nov;91(3):547-57.

Arispe N, Pollard HB, Rojas E. The ability of amyloid beta-protein [A beta P (1-40)] to form Ca²⁺ channels provides a mechanism for neuronal death in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 1994 Dec 15;747:256-66. Review

Aryal P, Dvir H, Choe S, Slesinger PA. A discrete alcohol pocket involved in GIRK channel activation. *Nat Neurosci.* 2009 Aug;12(8):988-95. Epub 2009 Jun 28.

Ashenafi S, Fuente A, Criado JM, Rioloobos AS, Heredia M, Yajeya J. Beta - Amyloid peptide25-35 depresses excitatory synaptic transmission in the rat basolateral amygdala "in vitro". *Neurobiol Aging.* 2005 Apr;26(4):419-28.

Atzori M, Lau D, Tansey EP, Chow A, Ozaita A, Rudy B, McBain CJ. H2 histamine receptor-phosphorylation of Kv3.2 modulates interneuron fast spiking. *Nat Neurosci.* 2000 Aug;3(8):791-8.

Avshalumov MV, Rice ME. Activation of ATP-sensitive K⁺ (K(ATP)) channels by H₂O₂ underlies glutamate-dependent inhibition of striatal dopamine release. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Sep 30;100(20):11729-34.

Bartesaghi R. Effect of early isolation on the synaptic function in the dentate gyrus and field CA1 of the guinea pig. *Hippocampus.* 2004;14(4):482-98.

Bartesaghi R, Severi S. Effects of early environment on field CA3a pyramidal neuron morphology in the guinea-pig. *Neuroscience.* 2002;110(3):475-88.

Ben-Ari Y, Khazipov R, Leinekugel X, Caillard O, Gaiarsa JL. GABAA, NMDA and AMPA receptors: a developmentally regulated 'ménage à trois'. *Trends Neurosci.* 1997 Nov;20(11):523-9. Review.

Bennett MR, Gibson WG, Robinson J. Dynamics of the CA3 pyramidal neuron autoassociative memory network in the hippocampus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1994 Jan 29;343(1304):167-87.

Berger T, Schwarz C, Kraushaar U, Monyer H. Dentate gyrus basket cell GABAA receptors are blocked by Zn²⁺ via changes of their desensitization kinetics: an in situ patch-clamp and single-cell PCR study. *J Neurosci.* 1998 Apr 1;18(7):2437-48.

Berthelot P, Vaccher C, Flouquet N, Debaert M, Luyckx M, Brunet C. 3 -Thienyl- and 3-furylaminobutyric acids. Synthesis and binding GABAB receptor studies. *J Med Chem.* 1991 Aug;34(8):2557-60.

Bezprozvanny I, Mattson MP. Neuronal calcium mishandling and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 2008 Sep;31(9):454-63. Epub 2008 Jul 31. Review

Bettler B, Kaupmann K, Mosbacher J, Gassmann M. Molecular structure and physiological functions of GABA(B) receptors. *Physiol Rev.* 2004 Jul;84(3):835-67. Review.

Bilkey DK, Schwartzkroin PA. Variation in electrophysiology and morphology of hippocampal CA3 pyramidal cells. *Brain Res.* 1990 Apr 23;514(1):77 -83.

Bischofberger J, Engel D, Li L, Geiger JR, Jonas P. Patch-clamp recording from mossy fiber terminals in hippocampal slices. *Nat Protoc.* 2006;1(4):2075 -81.

Blackstad TW. Commissural connections of the hippocampal region in the rat, with special reference to their mode of termination. *J Comp Neurol.* 1956 Oct;105(3):417 -537.

Blanchard BJ, Stockwell BR, Ingram VM. Eliminating membrane depolarization caused by the Alzheimer peptide Abeta(1 -42, aggr.). *Biochem Biophys Res Commun.* 2002a May 17;293(4):1204-8.

Blanchard BJ, Thomas VL, Ingram VM. Mechanism of membrane depolarization caused by the Alzheimer Abeta1 -42 peptide. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002b May 17;293(4):1197-203.

Bland BH, Colom LV. Extrinsic and intrinsic properties underlying oscillation and synchrony in limbic cortex. *Prog Neurobiol.* 1993 Aug;41(2):157 -208. Review

Bland BH, Oddie SD. Theta band oscillation and synchrony in the hippocampal formation and associated structures: the case for its role in sensorimotor integration. *Behav Brain Res.* 2001 Dec 14;127(1 -2):119-36.

Bliss TV, Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol.* 1973 Jul;232(2):331 -56.

Bliss TV, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long -term potentiation in the hippocampus. *Nature.* 1993 Jan 7;361(6407):31 -9. Review.

Bloss EB, Hunter RG. Hippocampal kainate receptors. *Vitam Horm.* 2010;82:167 -84. Review.

Bormann J, Hamill OP, Sakmann B. Mechanism of anion permeation through channels gated by glycine and gamma-aminobutyric acid in mouse cultured spinal neurones. *J Physiol.* 1987 Apr;385:243 -86. Review.

Bossu JL, Capogna M, Debanne D, McKinney RA, Gähwiler BH. Somatic voltage -gated potassium currents of rat hippocampal pyramidal cells in organotypic slice cultures. *J Physiol.* 1996 Sep 1;495 (Pt 2):367 -81.

Bowery NG, Bettler B, Froestl W, Gallagher JP, Marshall F, Raiteri M, Bonner TI, Enna SJ. International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian gamma-aminobutyric acid(B) receptors: structure and function. *Pharmacol Rev.* 2002 Jun;54(2):247-64. Review.

Bowery NG. GABAB receptor: a site of therapeutic benefit. *Curr Opin Pharmacol.* 2006 Feb;6(1):37-43.

Brito GN, Brito LS. Septohippocampal system and the prelimbic sector of frontal cortex: a neuropsychological battery analysis in the rat. *Behav Brain Res.* 1990 Jan 1;36(1-2):127-46.

Broadbent NJ, Squire LR, Clark RE. Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Oct 5;101(40):14515 -20. Epub 2004 Sep 27.

Brown DA. Muscarinic acetylcholine receptors (mAChRs) in the nervous system: some functions and mechanisms. *J Mol Neurosci.* 2010 Jul;41(3):340 -6. Epub 2010 May 6. Review.

Brown DA, Constanti A. Intracellular observations on the effects of muscarinic agonists on rat sympathetic neurones. *Br J Pharmacol.* 1980 Dec;70(4):593 -608.

Brun VH, Leutgeb S, Wu HQ, Schwarcz R, Witter MP, Moser EI, Moser MB. Impaired spatial representation in CA1 after lesion of direct input from entorhinal cortex. *Neuron.* 2008 Jan 24;57(2):290 -302.

Buckmaster PS, Strowbridge BW, Kunkel DD, Schmiede DL, Schwartzkroin PA. Mossy cell axonal projections to the dentate gyrus molecular layer in the rat hippocampal slice. *Hippocampus.* 1992 Oct;2(4):349 -62.

Buckmaster PS, Wenzel HJ, Kunkel DD, Schwartzkroin PA. Axon arbors and synaptic connections of hippocampal mossy cells in the rat in vivo. *J Comp Neurol.* 1996 Mar 4;366(2):271 -92.

Butterfield DA, Bush AI. Alzheimer's amyloid beta-peptide (1-42): involvement of methionine residue 35 in the oxidative stress and neurotoxicity properties of this peptide. *Neurobiol Aging.* 2004 May-Jun;25(5):563-8. Review

Buzsáki G. Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron.* 2002 Jan 31;33(3):325-40. Review.

Calabrese B, Shaked GM, Tabarean IV, Braga J, Koo EH, Halpain S. Rapid, concurrent alterations in pre- and postsynaptic structure induced by naturally -secreted amyloid-beta protein. *Mol Cell Neurosci.* 2007 Jun;35(2):183 -93. Epub 2007 Feb 12.

Canteras NS, Swanson LW. Projections of the ventral subiculum to the amygdala, septum, and hypothalamus: a PHAL anterograde tract-tracing study in the rat. *J Comp Neurol.* 1992 Oct 8;324(2):180 -94.

Carrascal L, Nieto-Gonzalez JL, Torres B, Nunez-Abades P. Changes in somatodendritic morphometry of rat oculomotor nucleus motoneurons during postnatal development. *J Comp Neurol.* 2009 May 10;514(2):189 -202.

Carrasco GA, Van de Kar LD. Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur J Pharmacol.* 2003 Feb 28;463(1-3):235-72. Review.

Catterall WA. Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1980;20:15 -43. Review.

Cenquizca LA, Swanson LW. Analysis of direct hippocampal cortical field CA1 axonal projections to diencephalon in the rat. *J Comp Neurol*. 2006 Jul 1;497(1):101 -14.

Cenquizca LA, Swanson LW. Spatial organization of direct hippocampal field CA1 axonal projections to the rest of the cerebral cortex. *Brain Res Rev*. 2007 Nov;56(1):1 -26. Epub 2007 May 10. Review.

Chao LP, Kan KS, Hung FM. Immunohistochemical localization of choline acetyltransferase in rabbit forebrain. *Brain Res*. 1982 Mar 4;235(1):65 -82.

Chapman PF, White GL, Jones MW, Cooper-Blacketer D, Marshall VJ, Irizarry M, Younkin L, Good MA, Bliss TV, Hyman BT, Younkin SG, Hsiao KK. Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice. *Nat Neurosci*. 1999 Mar;2(3):271 -6.

Charpak S, Gähwiler BH, Do KQ, Knöpfel T. Potassium conductances in hippocampal neurons blocked by excitatory amino-acid transmitters. *Nature*. 1990 Oct 25;347(6295):765-7.

Chattarji S, Stanton PK, Sejnowski TJ. Commissural synapses, but not mossy fiber synapses, in hippocampal field CA3 exhibit associative long-term potentiation and depression. *Brain Res*. 1989 Aug 21;495(1):145 -50.

Chen QS, Kagan BL, Hirakura Y, Xie CW. Impairment of hippocampal long-term potentiation by Alzheimer amyloid beta-peptides. *J Neurosci Res*. 2000 Apr 1;60(1):65 -72.

Chen QS, Wei WZ, Shimahara T, Xie CW. Alzheimer amyloid beta-peptide inhibits the late phase of long-term potentiation through calcineurin-dependent mechanisms in the hippocampal dentate gyrus. *Neurobiol Learn Mem*. 2002 May;77(3):354 -71

Chen X, Johnston D. Constitutively active G-protein-gated inwardly rectifying K⁺ channels in dendrites of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci*. 2005 Apr 13;25(15):3787-92

Cheng YF, Wang C, Lin HB, Li YF, Huang Y, Xu JP, Zhang HT. Inhibition of phosphodiesterase-4 reverses memory deficits produced by A₂₅₋₃₅ or A₁₋₄₀ peptide in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 2010 Oct;212(2):181 -91. Epub 2010 Jul 17.

Chételat G, Villemagne VL, Pike KE, Ellis KA, Bourgeat P, Jones G, O'Keefe GJ, Salvado O, Szoëke C, Martins RN, Ames D, Masters CL, Rowe CC; Australian Imaging Biomarkers and Lifestyle Study of ageing (AIBL) Research Group. Independent contribution of temporal beta-amyloid deposition to memory decline in the pre-dementia phase of Alzheimer's disease. *Brain*. 2011 Mar;134(Pt 3):798 -807. Epub 2011 Feb 9.

Chevalleyre V, Siegelbaum SA. Strong CA2 pyramidal neuron synapses define a powerful disynaptic cortico-hippocampal loop. *Neuron*. 2010 May 27;66(4):560-72

Chitwood RA, Jaffe DB. Calcium-dependent spike-frequency accommodation in hippocampal CA3 nonpyramidal neurons. *J Neurophysiol*. 1998 Aug;80(2):983-8.

Choi DW. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*. 1988 Oct;1(8):623-34. Review.

Chu DC, Penney JB Jr, Young AB. Cortical GABAB and GABAA receptors in Alzheimer's disease: a quantitative autoradiographic study. *Neurology*. 1987a Sep;37(9):1454-9.

Chu DC, Penney JB Jr, Young AB. Quantitative autoradiography of hippocampal GABAB and GABAA receptor changes in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 1987b Dec 4;82(3):246-52.

Chung HJ, Ge WP, Qian X, Wiser O, Jan YN, Jan LY. G protein-activated inwardly rectifying potassium channels mediate depotentiation of long-term potentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Jan 13;106(2):635-40. Epub 2008 Dec 31.

Ciruela F, Fernández-Dueñas V, Sahlholm K, Fernández-Alacid L, Nicolau JC, Watanabe M, Luján R. Evidence for oligomerization between GABAB receptors and GIRK channels containing the GIRK1 and GIRK3 subunits. *Eur J Neurosci*. 2010 Oct;32(8):1265-77.

Claiborne BJ, Amaral DG, Cowan WM. A light and electron microscopic analysis of the mossy fibers of the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol*. 1986 Apr 22;246(4):435-58.

Claiborne BJ, Amaral DG, Cowan WM. Quantitative, three-dimensional analysis of granule cell dendrites in the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol*. 1990 Dec 8;302(2):206-19.

Clementi ME, Misiti F. Substitution of methionine 35 inhibits apoptotic effects of Abeta(31-35) and Abeta(25-35) fragments of amyloid-beta protein in PC12 cells. *Med Sci Monit*. 2005 Nov;11(11):BR381-5.

Colom LV. Septal networks: relevance to theta rhythm, epilepsy and Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 2006 Feb;96(3):609-23.

Colom LV, Castañeda MT, Bañuelos C, Puras G, García-Hernández A, Hernandez S, Mounsey S, Benavidez J, Lehker C. Medial septal beta-amyloid 1-40 injections alter septo-hippocampal anatomy and function. *Neurobiol Aging*. 2010 Jan;31(1):46-57.

Cooke SF, Bliss TV. Long-term potentiation and cognitive drug discovery. *Curr Opin Investig Drugs*. 2005 Jan;6(1):25-34. Review.

Cosgrove KE, Galván EJ, Barrionuevo G, Meriney SD. mGluRs Modulate Strength and Timing of Excitatory Transmission in Hippocampal Area CA3. *Mol Neurobiol*. 2011 May 11.

Coyle JT, Price DL, DeLong MR. Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science*. 1983 Mar 11;219(4589):1184-90. Review.

Cowburn RF, Wiehager B, Trief E, Li-Li M, Sundström E. Effects of beta-amyloid-(25-35) peptides on radioligand binding to excitatory amino acid receptors and voltage-dependent calcium channels: evidence for a selective affinity for the glutamate and glycine recognition sites of the NMDA receptor. *Neurochem Res*. 1997 Dec;22(12):1437-42.

Criado-Alvarez JJ, Romo Barrientos C. [Variability and trends in dementia drug consumption in Castile-La Mancha (Spain). Estimated prevalence of Alzheimer's disease]. *Neurologia*. 2010 May;25(4):234-8.

Cummings JL. Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 2004 Jul 1;351(1):56-67. Review.

Czurkó A, Huxter J, Li Y, Hangya B, Muller RU. Theta phase classification of interneurons in the hippocampal formation of freely moving rats. *J Neurosci*. 2011 Feb 23;31(8):2938-47.

Dani JA. Overview of nicotinic receptors and their roles in the central nervous system. *Biol Psychiatry*. 2001 Feb 1;49(3):166-74. Review.

Davies P, Maloney AJ. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet*. 1976 Dec 25;2(8000):1403.

Davis S, Butcher SP, Morris RG. The NMDA receptor antagonist D-2-amino-5-phosphonopentanoate (D-AP5) impairs spatial learning and LTP in vivo at intracerebral concentrations comparable to those that block LTP in vitro. *J Neurosci*. 1992 Jan;12(1):21-34.

Dasari S, Gullledge AT. M1 and M4 receptors modulate hippocampal pyramidal neurons. *J Neurophysiol*. 2011 Feb;105(2):779-92. Epub 2010 Dec 15.

Dascal N. Signalling via the G protein-activated K⁺ channels. *Cell Signal*. 1997 Dec;9(8):551-73. Review.

DeCarli C. Mild cognitive impairment: prevalence, prognosis, aetiology, and treatment. *Lancet Neurol*. 2003 Jan;2(1):15-21. Review

De la Vega, R. y Zambrano, A. Criterios diagnósticos de las demencias [en línea]. La Circunvalación del hipocampo, abril 2011. Disponible en: <http://www.hipocampo.org/criterios.asp>.

De Leo G, Brivio E, Sautter SW. Supporting autobiographical memory in patients with Alzheimer's disease using smart phones. *Appl Neuropsychol*. 2011 Jan;18(1):69 - 76.

Degroot A, Treit D. Septal GABAergic and hippocampal cholinergic systems interact in the modulation of anxiety. *Neuroscience*. 2003;117(2):493 -501

Ding SL, Haber SN, Van Hoesen GW. Stratum radiatum of CA2 is an additional target of the perforant path in humans and monkeys. *Neuroreport*. 2010 Mar 10;21(4):245-9.

Dolleman-Van der Weel MJ, Lopes da Silva FH, Witter MP. Nucleus reuniens thalami modulates activity in hippocampal field CA1 through excitatory and inhibitory mechanisms. *J Neurosci*. 1997 Jul 15;17(14):5640 -50.

Dolphin AC. G protein modulation of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev*. 2003 Dec;55(4):607-27. Review Dutar P, Nicoll RA. A physiological role for GABAB receptors in the central nervous system. *Nature*. 1988 Mar 10;332(6160):156 - 8.

Drake CT, Bausch SB, Milner TA, Chavkin C. GIRK1 immunoreactivity is present predominantly in dendrites, dendritic spines, and somata in the CA 1 region of the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Feb 4;94(3):1007 -12.

Ekstrom AD, Kahana MJ, Caplan JB, Fields TA, Isham EA, Newman EL, Fried I. Cellular networks underlying human spatial navigation. *Nature*. 2003 Sep 11;425(6954):184-8.

Emri Z, Turner JP, Crunelli V. Tonic activation of presynaptic GABA(B) receptors on thalamic sensory afferents. *Neuroscience*. 1996 Jun;72(3):689 -98.

Enyedi P, Czirják G. Molecular background of leak K⁺ currents: two -pore domain potassium channels. *Physiol Rev*. 2010 Apr;90(2):559-605. Review

Ergorul C, Eichenbaum H. The hippocampus and memory for "what," "where," and "when". *Learn Mem*. 2004 Jul-Aug;11(4):397-405. Epub 2004 Jul 14.

Fagni L, Chavis P, Ango F, Bockaert J. Complex interactions between mGluRs, intracellular Ca²⁺ stores and ion channels in neurons. *Trends Neurosci*. 2000 Feb;23(2):80-8. Review.

Farrant M, Kaila K. The cellular, molecular and ionic basis of GABA(A) receptor signalling. *Prog Brain Res*. 2007;160:59-87. Review.

Farrar SJ, Whiting PJ, Bonnert TP, McKernan RM. Stoichiometry of a ligand-gated ion channel determined by fluorescence energy transfer. *J Biol Chem*. 1999 Apr 9;274(15):10100-4.

Fraser SP, Suh YH, Djamgoz MB. Ionic effects of the Alzheimer's disease beta - amyloid precursor protein and its metabolic fragments. *Trends Neurosci.* 1997 Feb;20(2):67-72. Review.

Freir DB, Holscher C, Herron CE. Blockade of long-term potentiation by beta-amyloid peptides in the CA1 region of the rat hippocampus in vivo. *J Neurophysiol.* 2001 Feb;85(2):708-13.

Freir DB, Costello DA, Herron CE. A beta 25-35-induced depression of long-term potentiation in area CA1 in vivo and in vitro is attenuated by verapamil. *J Neurophysiol.* 2003 Jun;89(6):3061-9. Epub 2003 Feb 5.

Freund TF, Antal M. GABA-containing neurons in the septum control inhibitory interneurons in the hippocampus. *Nature.* 1988 Nov 10;336(6195):170 -3.

Freund TF, Buzsáki G. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus.* 1996;6(4):347-470. Review.

Freund TF, Gulyás AI. Inhibitory control of GABAergic interneurons in the hippocampus. *Can J Physiol Pharmacol.* 1997 May;75(5):479 -87. Review.

Frozza RL, Horn AP, Hoppe JB, Simão F, Gerhardt D, Comiran RA, Salbego CG. A comparative study of beta-amyloid peptides Abeta1-42 and Abeta25-35 toxicity in organotypic hippocampal slice cultures. *Neurochem Res.* 2009 Feb;34(2):295 -303. Epub 2008 Aug 7.

Furukawa K, Barger SW, Blalock EM, Mattson MP. Activation of K⁺ channels and suppression of neuronal activity by secreted beta-amyloid-precursor protein. *Nature.* 1996 Jan 4;379(6560):74-8.

Furukawa K, Abe Y, Akaike N. Amyloid beta protein-induced irreversible current in rat cortical neurones. *Neuroreport.* 1994 Oct 27;5(16):2016 -8. Rovira C, Arbez N, Mariani J. Abeta(25-35) and Abeta(1-40) act on different calcium channels in CA1 hippocampal neurons. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Sep 6;296(5):1317 -21.

Gaiarsa JL, Beaudoin M, Ben-Ari Y. Effect of neonatal degranulation on the morphological development of rat CA3 pyramidal neurons: inductive role of mossy fibers on the formation of thorny excrescences. *J Comp Neurol.* 1992 Jul 22;321(4):612-25.

Galimberti D, Scarpini E. Disease-modifying treatments for Alzheimer's disease. *Ther Adv Neurol Disord.* 2011 Jul;4(4):203-16.

Gerashchenko D, Salin-Pascual R, Shiromani PJ. Effects of hypocretin-saporin injections into the medial septum on sleep and hippocampal theta. *Brain Res.* 2001 Sep 14;913(1):106-15.

Garcia R, Tocco G, Baudry M, Thompson RF. Exposure to a conditioned aversive environment interferes with long-term potentiation induction in the fimbria-CA3 pathway. *Neuroscience.* 1998 Jan;82(1):139 -45.

García-López P, García-Marín V, Freire M. The discovery of dendritic spines by Cajal in 1888 and its relevance in the present neuroscience. *Prog Neurobiol*. 2007 Oct;83(2):110-30. Epub 2007 Jun 19.

Gaykema RP, Luiten PG, Nyakas C, Traber J. Cortical projection patterns of the medial septum-diagonal band complex. *J Comp Neurol*. 1990 Mar 1;293(1):103-24.

Geiger JR, Melcher T, Koh DS, Sakmann B, Seeburg PH, Jonas P, Monyer H. Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca²⁺ permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS. *Neuron*. 1995 Jul;15(1):193-204.

Gilbert PE, Brushfield AM. The role of the CA3 hippocampal subregion in spatial memory: a process oriented behavioral assessment. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2009 Aug 1;33(5):774-81. Review.

Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*. 1991 Feb 21;349(6311):704-6.

Goedert M, Spillantini MG. A century of Alzheimer's disease. *Science*. 2006;314(5800):777-781.

González JC, Albiñana E, Baldelli P, García AG, Hernández-Guijo JM. Presynaptic muscarinic receptor subtypes involved in the enhancement of spontaneous GABAergic postsynaptic currents in hippocampal neurons. *Eur J Neurosci*. 2011 Jan;33(1):69-81. doi: 10.1111/j.1460-9568.2010.07475.x. Epub 2010 Nov 23.

Gorelova N, Reiner PB. Role of the afterhyperpolarization in control of discharge properties of septal cholinergic neurons in vitro. *J Neurophysiol*. 1996 Feb;75(2):695-706.

Grace EA, Rabiner CA, Busciglio J. Characterization of neuronal dystrophy induced by fibrillar amyloid beta: implications for Alzheimer's disease. *Neuroscience*. 2002;114(1):265-73.

Gray, JA; McNaughton N. *The Neuropsychology of Anxiety: An Enquiry into the Functions of the Septo-Hippocampal System*. Oxford University Press. 2000.

Greenstein B, Greenstein A. *Color Atlas of Neuroscience. Neuroanatomy and Neurophysiology*. Thieme Stuttgart · New York. 2000.

Gruden MA, Davudova TB, Malisauskas M, Zamotin VV, Sewell RD, Voskresenskaya NI, Kostanyan IA, Sherstnev VV, Morozova-Roche LA. Autoimmune responses to amyloid structures of Abeta(25-35) peptide and human lysozyme in the serum of patients with progressive Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2004;18(2):165-71. Epub 2004 Jun 21.

Grybko MJ, Hahm ET, Perrine W, Parnes JA, Chick WS, Sharma G, Finger TE, Vijayaraghavan S. A transgenic mouse model reveals fast nicotinic transmission in hippocampal pyramidal neurons. *Eur J Neurosci*. 2011 May;33(10):1786-98. doi: 10.1111/j.1460-9568.2011.07671.x. Epub 2011 Apr 19.

Gu N, Vervaeke K, Hu H, Storm JF. Kv7/KCNQ/M and HCN/h, but not KCa2/SK channels, contribute to the somatic medium after-hyperpolarization and excitability control in CA1 hippocampal pyramidal cells. *J Physiol*. 2005 Aug 1;566(Pt 3):689-715.

Gutiérrez R. The GABAergic phenotype of the "glutamatergic" granule cells of the dentate gyrus. *Prog Neurobiol*. 2003 Dec;71(5):337-58. Review.

Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti MC, Stühmer W, Wang X. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev*. 2005 Dec;57(4):473-508. Review.

Hammond C. *Cellular and Molecular Neurobiology*. Academic Press, San Diego, CA. 1996.

Haglund L, Swanson LW, Köhler C. The projection of the supramammillary nucleus to the hippocampal formation: an immunohistochemical and anterograde transport study with the lectin PHA-L in the rat. *J Comp Neurol*. 1984 Oct 20;229(2):171-85.

Harkany T, Abrahám I, Timmerman W, Laskay G, Tóth B, Sasvári M, Kónya C, Sebens JB, Korf J, Nyakas C, Zarándi M, Soós K, Penke B, Luiten PG. beta-amyloid neurotoxicity is mediated by a glutamate-triggered excitotoxic cascade in rat nucleus basalis. *Eur J Neurosci*. 2000 Aug;12(8):2735-45.

Harish OE, Role LW. Activation of phosphoinositide turnover and protein kinase C by neurotransmitters that modulate calcium channels in embryonic chick sensory neurons. *Int J Dev Neurosci*. 1992 Oct;10(5):421-33.

Hasselmo ME, Bodelón C, Wyble BP. A proposed function for hippocampal theta rhythm: separate phases of encoding and retrieval enhance reversal of prior learning. *Neural Comput*. 2002 Apr;14(4):793-817.

Heinemann U, Stabel J, Rausche G. Activity-dependent ionic changes and neuronal plasticity in rat hippocampus. *Prog Brain Res*. 1990;83:197-214. Review.

Hemond P, Epstein D, Boley A, Migliore M, Ascoli GA, Jaffe DB. Distinct classes of pyramidal cells exhibit mutually exclusive firing patterns in hippocampal area CA3b. *Hippocampus*. 2008;18(4):411-24.

Hemond P, Migliore M, Ascoli GA, Jaffe DB. The membrane response of hippocampal CA3b pyramidal neurons near rest: Heterogeneity of passive properties

and the contribution of hyperpolarization-activated currents. *Neuroscience*. 2009 May 5;160(2):359-70. Epub 2009 Feb 13

Hestrin S, Nicoll RA, Perkel DJ, Sah P. Analysis of excitatory synaptic action in pyramidal cells using whole-cell recording from rat hippocampal slices. *J Physiol*. 1990 Mar;422:203-25.

Holdstock JS, Mayes AR, Cezayirli E, Isaac CL, Aggleton JP, Roberts N. A comparison of egocentric and allocentric spatial memory in a patient with selective hippocampal damage. *Neuropsychologia*. 2000;38(4):410-25.

Huh CY, Goutagny R, Williams S. Glutamatergic neurons of the mouse medial septum and diagonal band of Broca synaptically drive hippocampal pyramidal cells: relevance for hippocampal theta rhythm. *J Neurosci*. 2010 Nov 24;30(47):15951-61.

Hunsaker MR, Tran GT, Kesner RP. A behavioral analysis of the role of CA3 and CA1 subcortical efferents during classical fear conditioning. *Behav Neurosci*. 2009 Jun;123(3):624-30

Ikeda K, Kobayashi T, Ichikawa T, Usui H, Kumanishi T. Functional couplings of the delta- and the kappa-opioid receptors with the G-protein-activated K⁺ channel. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995a Mar 8;208(1):302-8.

Ikeda SR, Lovinger DM, McCool BA, Lewis DL. Heterologous expression of metabotropic glutamate receptors in adult rat sympathetic neurons: subtype-specific coupling to ion channels. *Neuron*. 1995 b May;14(5):1029-38.

Inanobe A, Fujita S, Makino Y, Matsushita K, Ishii M, Chachin M, Kurachi Y. Interaction between the RGS domain of RGS4 with G protein alpha subunits mediates the voltage-dependent relaxation of the G protein-gated potassium channel. *J Physiol*. 2001 Aug 15;535(Pt 1):133-43.

Iniguez J. El deterioro cognitivo leve (2): factores predictivos y abordaje terapeutico. *Informes Portal Mayores* 2006; 46: 1-20.

Ireland DR, Abraham WC. Mechanisms of group I mGluR-dependent long-term depression of NMDA receptor-mediated transmission at Schaffer collateral-CA1 synapses. *J Neurophysiol*. 2009 Mar;101(3):1375-85. Epub 2008 Dec 24.

Ishizuka N, Weber J, Amaral DG. Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat. *J Comp Neurol*. 1990 May 22;295(4):580-623.

Ishizuka N, Cowan WM, Amaral DG. A quantitative analysis of the dendritic organization of pyramidal cells in the rat hippocampus. *J Comp Neurol*. 1995 Nov 6;362(1):17-45.

Isomoto S, Kondo C, Kurachi Y. Inwardly rectifying potassium channels: their molecular heterogeneity and function. *Jpn J Physiol*. 1997 Feb;47(1):11-39. Review.

Ito I, Kawakami R, Sakimura K, Mishina M, Sugiyama H. Input -specific targeting of NMDA receptor subtypes at mouse hippocampal CA3 pyramidal neuron synapses. *Neuropharmacology*. 2000 Apr 3;39(6):943 -51

Jhamandas JH, Cho C, Jassar B, Harris K, MacTavish D, Easaw J. Cellular mechanisms for amyloid beta-protein activation of rat cholinergic basal forebrain neurons. *J Neurophysiol*. 2001 Sep;86(3):1312-20.

Jin W, Lu Z. Synthesis of a stable form of tertiapin: a high -affinity inhibitor for inward-rectifier K⁺ channels. *Biochemistry*. 1999 Oct 26;38(43):14286 -93.

Johnson NA, Jahng GH, Weiner MW, Miller BL, Chui HC, Jagust WJ, Gorno -Tempini ML, Schuff N. Pattern of cerebral hypoperfusion in Alzheimer disease and mild cognitive impairment measured with arterial spin -labeling MR imaging: initial experience. *Radiology*. 2005 Mar;234(3):851 -9.

Kabogo D, Rauw G, Amritraj A, Baker G, Kar S. β -amyloid-related peptides potentiate K⁺-evoked glutamate release from adult rat hippocampal slices. *Neurobiol Aging*. 2010 Jul;31(7):1164-72. Epub 2008 Sep 25.

Kajiwarra R, Wouterlood FG, Sah A, Boekel AJ, Baks -te Bulte LT, Witter MP. Convergence of entorhinal and CA3 inputs onto pyramidal neurons and interneurons in hippocampal area CA1--an anatomical study in the rat. *Hippocampus*. 2008;18(3):266-80.

Kandel ER, Jessell TM, Schwartz JH. *Neurociencia y conducta*. Prentice Hall. Impreso en España, 1997.

Kao CY. Structure-activity relations of tetrodotoxin, saxitoxin, and analogues. *Ann N Y Acad Sci*. 1986;479:52-67.

Kapai NA, Solntseva EI, Skrebetskii VG. Donepezil eliminates suppressive effects of β -amyloid peptide (1-42) on long-term potentiation in the hippocampus. *Bull Exp Biol Med*. 2010 Jul;149(1):33-6.

Kar S, Seto D, Gaudreau P, Quirion R. Beta-amyloid-related peptides inhibit potassium-evoked acetylcholine release from rat hippocampal slices. *J Neurosci*. 1996 Feb 1;16(3):1034-40.

Karbon EW, Duman RS, Enna SJ. GABAB receptors and norepinephrine -stimulated cAMP production in rat brain cortex. *Brain Res*. 1984 Jul 23;306(1 -2):327-32.

Karlsson G, Pozza M, Olpe HR. Phaclofen: a GABAB blocker reduces long -duration inhibition in the neocortex. *Eur J Pharmacol*. 1988 Apr 13;148(3):485-6. Erratum in: *Eur J Pharmacol* 1988 Sep 23;154(3):352.

Kart-Teke E, De Souza Silva MA, Huston JP, Dere E. Wistar rats show episodic -like memory for unique experiences. *Neurobiol Learn Mem*. 2006 Mar;85(2):173 -82. Epub 2005 Nov 14.

Katzman R, Saitoh T. Advances in Alzheimer's disease. *FASEB J.* 1991 Mar 1;5(3):278-86. Review.

Kehl SJ, McLennan H. A pharmacological characterization of chloride - and potassium-dependent inhibitions in the CA3 region of the rat hippocampus in vitro. *Exp Brain Res.* 1985;60(2):309-17.

Kermer P, Naumann T, Bender R, Frotscher M. Fate of GABAergic septohippocampal neurons after fimbria-fornix transection as revealed by in situ hybridization for glutamate decarboxylase mRNA and parvalbumin immunocytochemistry. *J Comp Neurol.* 1995 Nov 20;362(3):385-99.

Kim DY, Fenoglio KA, Kerrigan JF, Rho JM. Bicarbonate contributes to GABAA receptor-mediated neuronal excitation in surgically resected human hypothalamic hamartomas. *Epilepsy Res.* 2009 Jan;83(1):89-93. Epub 2008 Nov 20

King AE, Lopez-Garcia JA, Cumberbatch M. Antagonism of synaptic potentials in ventral horn neurones by 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione: a study in the rat spinal cord in vitro. *Br J Pharmacol.* 1992 Oct;107(2):375-81.

Klingner M, Apelt J, Kumar A, Sorger D, Sabri O, Steinbach J, Scheunemann M, Schliebs R. Alterations in cholinergic and non-cholinergic neurotransmitter receptor densities in transgenic Tg2576 mouse brain with beta -amyloid plaque pathology. *Int J Dev Neurosci.* 2003 Nov;21(7):357-69.

Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science.* 1997 Feb 21;275(5303):1132-6

Kobayashi T, Ikeda K, Kojima H, Niki H, Yano R, Yoshioka T, Kumanishi T. Ethanol opens G-protein-activated inwardly rectifying K⁺ channels. *Nat Neurosci.* 1999 Dec;2(12):1091-7.

Köhler C, Chan-Palay V, Wu JY. Septal neurons containing glutamic acid decarboxylase immunoreactivity project to the hippocampal region in the rat brain. *Anat Embryol (Berl).* 1984;169(1):41-4.

Kollack-Walker S, Day HEW, Akil H, Central stress neurocircuits en Fink G. (ed.) *Encyclopedia of Stress*, New York, Academic Press 2000;1:414-423.

Komendantov AO, Ascoli GA. Dendritic excitability and neuronal morphology as determinants of synaptic efficacy. *J Neurophysiol.* 2009 Apr;101(4):1847-66. Epub 2009 Jan 28.

Kosik KS, Joachim CL, Selkoe DJ. Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986 Jun;83(11):4044-8.

Kotilinek LA, Bacsikai B, Westerman M, Kawarabayashi T, Younkin L, Hyman BT, Younkin S, Ashe KH. Reversible memory loss in a mouse transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2002 Aug 1;22(15):6331-5.

Kulik A, Vida I, Luján R, Haas CA, López-Bendito G, Shigemoto R, Frotscher M. Subcellular localization of metabotropic GABA(B) receptor subunits GABA(B1a/b) and GABA(B2) in the rat hippocampus. *J Neurosci*. 2003 Dec 3;23(35):11026-35.

Kulik A, Vida I, Fukazawa Y, Guetg N, Kasugai Y, Marker CL, Rigato F, Bettler B, Wickman K, Frotscher M, Shigemoto R. Compartment-dependent colocalization of Kir3.2-containing K⁺ channels and GABAB receptors in hippocampal pyramidal cells. *J Neurosci*. 2006 Apr 19;26(16):4289-97.

Kurinami H, Sato N, Shinohara M, Takeuchi D, Takeda S, Shimamura M, Ogihara T, Morishita R. Prevention of amyloid beta-induced memory impairment by fluvastatin, associated with the decrease in amyloid beta accumulation and oxidative stress in amyloid beta injection mouse model. *Int J Mol Med*. 2008 May;21(5):531-7.

Kurt S, Crook JM, Ohl FW, Scheich H, Schulze H. Differential effects of iontophoretic in vivo application of the GABA(A)-antagonists bicuculline and gabazine in sensory cortex. *Hear Res*. 2006 Feb;212(1-2):224-35. Epub 2006 Jan 25.

Lacaille JC, Williams S. Membrane properties of interneurons in stratum oriens-alveus of the CA1 region of rat hippocampus in vitro. *Neuroscience*. 1990;36(2):349-59.

Ladera C, del Carmen Godino M, José Cabañero M, Torres M, Watanabe M, Luján R, Sánchez-Prieto J. Pre-synaptic GABA receptors inhibit glutamate release through GIRK channels in rat cerebral cortex. *J Neurochem*. 2008 Dec;107(6):1506-17.

Lambert NA, Harrison NL, Kerr DI, Ong J, Prager RH, Teyler TJ. Blockade of the late IPSP in rat CA1 hippocampal neurons by 2-hydroxy-saclofen. *Neurosci Lett*. 1989 Dec 15;107(1-3):125-8.

Lancaster B, Nicoll RA. Properties of two calcium-activated hyperpolarizations in rat hippocampal neurones. *J Physiol*. 1987 Aug;389:187-203.

Lancaster B, Hu H, Ramakers GM, Storm JF. Interaction between synaptic excitation and slow afterhyperpolarization current in rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol*. 2001 Nov 1;536(Pt 3):809-23.

Lauer M, Senitz D. Dendritic excrescences seem to characterize hippocampal CA3 pyramidal neurons in humans. *J Neural Transm*. 2006 Oct;113(10):1469-75. Epub 2006 Feb 9.

Laurberg S. Commissural and intrinsic connections of the rat hippocampus. *J Comp Neurol*. 1979 Apr 15;184(4):685-708.

Leaney JL, Dekker LV, Tinker A. Regulation of a G protein-gated inwardly rectifying K⁺ channel by a Ca(2⁺)-independent protein kinase C. *J Physiol*. 2001 Jul 15;534(Pt. 2):367-79.

Leão RN, Colom LV, Borgius L, Kiehn O, Fisahn A. Medial septal dysfunction by A β -induced KCNQ channel-block in glutamatergic neurons. *Neurobiol Aging*. 2011 Sep 8.

Lee BY, Ban JY, Seong YH. Chronic stimulation of GABAA receptor with muscimol reduces amyloid beta protein (25-35)-induced neurotoxicity in cultured rat cortical cells. *Neurosci Res*. 2005 Aug;52(4):347-56.

Lee SE, SSB, Heldt SA, Zhao M, Schroeder JP, Vellano CP, Cowan DP, Ramineni S, Yates CK, Feng Y, Smith Y, Sweatt JD, Weinshenker D, Ressler KJ, Dudek SM, Hepler JR. RGS14 is a natural suppressor of both synaptic plasticity in CA2 neurons and hippocampal-based learning and memory. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Sep 28;107(39):16994-8. Epub 2010 Sep 13.

Lee SH, Soltesz I. Requirement for CB1 but not GABAB receptors in the cholecystokinin mediated inhibition of GABA release from cholecystokinin expressing basket cells. *J Physiol*. 2011 Feb 15;589(Pt 4):891-902. Epub 2010 Dec 20.

Lega BC, Jacobs J, Kahana M. Human hippocampal theta oscillations and the formation of episodic memories. *Hippocampus*. 2011 Apr 27. doi: 10.1002/hipo.20937.

Leranth C, Hajszan T. Extrinsic afferent systems to the dentate gyrus. *Prog Brain Res*. 2007;163:63-84. Review.

Lerma J, Paternain AV, Naranjo JR, Mellström B. Functional kainate-selective glutamate receptors in cultured hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Dec 15;90(24):11688-92.

Lerma J. Roles and rules of kainate receptors in synaptic transmission. *Nat Rev Neurosci*. 2003 Jun;4(6):481-95. Review.

Lipp HP, Amrein I, Slominanka L, Wolfer DP. Natural genetic variation of hippocampal structures and behaviour. In: *cellular and quantitative methods in neurogenetics: methods in life sciences* (Jones BC, Mormede P, eds), pp 217-235. Boca Raton, FL: CRC Press. 1999.

López-Bendito G, Shigemoto R, Kulik A, Vida I, Fairén A, Luján R. Distribution of metabotropic GABA receptor subunits GABAB1a/b and GABAB2 in the rat hippocampus during prenatal and postnatal development. *Hippocampus*. 2004;14(7):836-48.

Lorente de Nó R. Studies on the structure of cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. *J Psychol Neurol*. 1933; 46:113-177.

Losonczy A, Zemelman BV, Vaziri A, Magee JC. Network mechanisms of theta related neuronal activity in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nat Neurosci*. 2010 Aug;13(8):967-72. Epub 2010 Jul 18.

Lu P, Mamiya T, Lu L, Mouri A, Ikejima T, Kim HC, Zou LB, Nabeshima T. Xanthoceraside attenuates amyloid peptide(25-35)-induced learning and memory impairments in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 2011 Jul 7.

Luján R, Maylie J, Adelman JP. New sites of action for GIRK and SK channels. *Nat Rev Neurosci*. 2009 Jul;10(7):475-80. Review.

Luo T, Leung LS. Endogenous histamine facilitates long-term potentiation in the hippocampus during walking. *J Neurosci*. 2010 Jun 9;30(23):7845-52.

Lüscher C, Jan LY, Stoffel M, Malenka RC, Nicoll RA. G protein-coupled inwardly rectifying K⁺ channels (GIRKs) mediate postsynaptic but not presynaptic transmitter actions in hippocampal neurons. *Neuron*. 1997 Sep;19(3):687-95. Erratum in: *Neuron* 1997 Oct;19(4):following 945.

Lüscher C, Slesinger PA. Emerging roles for G protein-gated inwardly rectifying potassium (GIRK) channels in health and disease. *Nat Rev Neurosci*. 2010 May;11(5):301-15.

Lynch G, Rose G, Gall C. Anatomical and functional aspects of the septo-hippocampal projections. *Ciba Found Symp*. 1977;(58):5-24.

Maccaferri G, Roberts JD, Szucs P, Cottingham CA, Somogyi P. Cell surface domain specific postsynaptic currents evoked by identified GABAergic neurones in rat hippocampus in vitro. *J Physiol*. 2000 Apr 1;524 Pt 1:91-116. Erratum in: *J Physiol* 2000 Nov 1;528(Pt 3):669.

Maccioni RB, Muñoz JP, Barbeito L. The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Arch Med Res*. 2001 Sep-Oct;32(5):367-81. Review.

Madison DV, Nicoll RA. Control of the repetitive discharge of rat CA 1 pyramidal neurones in vitro. *J Physiol*. 1984 Sep;354:319-31.

Maki M, Matsukawa N, Yuasa H, Otsuka Y, Yamamoto T, Akatsu H, Okamoto T, Ueda R, Ojika K. Decreased expression of hippocampal cholinergic neurostimulating peptide precursor protein mRNA in the hippocampus in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2002 Feb;61(2):176-85.

Matsuzaki K. Physicochemical interactions of amyloid beta-peptide with lipid bilayers. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Aug;1768(8):1935-42. Epub 2007 Feb 20. Review.

McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS -ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*. 1984 Jul;34(7):939-44.

Madison DV, Nicoll RA. Control of the repetitive discharge of rat CA 1 pyramidal neurones in vitro. *J Physiol*. 1984 Sep;354:319-31.

Maioli F, Coveri M, Pagni P, Chiandetti C, Marchetti C, Ciarrocchi R, Ruggero C, Nativio V, Onesti A, D'Anastasio C, Pedone V. Conversion of mild cognitive impairment to dementia in elderly subjects: a preliminary study in a memory and cognitive disorder unit. *Arch Gerontol Geriatr*. 2007;44 Suppl 1:233-41.

Maki M, Matsukawa N, Yuasa H, Otsuka Y, Yamamoto T, Akatsu H, Okamoto T, Ueda R, Ojika K. Decreased expression of hippocampal cholinergic neurostimulating peptide precursor protein mRNA in the hippocampus in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2002 Feb;61(2):176-85.

Malouf AT, Robbins CA, Schwartzkroin PA. Phaclofen inhibition of the slow inhibitory postsynaptic potential in hippocampal slice cultures: a possible role for the GABAB-mediated inhibitory postsynaptic potential. *Neuroscience*. 1990;35(1):53-61.

Malcangio M, Bowery NG. Spinal cord SP release and hyperalgesia in monoarthritic rats: involvement of the GABAB receptor system. *Br J Pharmacol*. 1994 Dec;113(4):1561-6.

Malouf AT, Robbins CA, Schwartzkroin PA. Phaclofen inhibition of the slow inhibitory postsynaptic potential in hippocampal slice cultures: a possible role for the GABAB-mediated inhibitory postsynaptic potential. *Neuroscience*. 1990;35(1):53-61.

Mandelkow EM, Biernat J, Drewes G, Gustke N, Trinczek B, Mandelkow E. Tau domains, phosphorylation, and interactions with microtubules. *Neurobiol Aging*. 1995 May-Jun;16(3):355-62; discussion 362-3. Review.

Mangan PS, Sun C, Carpenter M, Goodkin HP, Sieghart W, Kapur J. Cultured Hippocampal Pyramidal Neurons Express Two Kinds of GABAA Receptors. *Mol Pharmacol*. 2005 Mar;67(3):775-88. Epub 2004 Dec 21.

Maqueda J, Ramírez M, Lamas M, Gutiérrez R. Glutamic acid decarboxylase (GAD)67, but not GAD65, is constitutively expressed during development and transiently overexpressed by activity in the granule cells of the rat. *Neurosci Lett*. 2003 Dec 15;353(1):69-71

Marcello E, Epis R, Di Luca M. Amyloid flirting with synaptic failure: towards a comprehensive view of Alzheimer's disease pathogenesis. *Eur J Pharmacol*. 2008 May 6;585(1):109-18. Epub 2008 Mar 4. Review

Markesbery WR. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med*. 1997;23(1):134-47. Review

Massone S, Vassallo I, Fiorino G, Castelnuovo M, Barbieri F, Borghi R, Tabaton M, Robello M, Gatta E, Russo C, Florio T, Dieci G, Cancedda R, Pagano A. 17A, a novel non-coding RNA, regulates GABA B alternative splicing and signaling in response to inflammatory stimuli and in Alzheimer disease. *Neurobiol Dis.* 2011 Feb;41(2):308 -17.

Masukawa LM, Benardo LS, Prince DA. Variations in electrophysiological properties of hippocampal neurons in different subfields. *Brain Res.* 1982 Jun 24;242(2):341-4.

Megías M, Emri Z, Freund TF, Gulyás AI. Total number and distribution of inhibitory and excitatory synapses on hippocampal CA1 pyramidal cells. *Neuroscience.* 2001;102(3):527-40.

Meir A. GABA (B) Receptors: an Example of Subtle Modulations in a Neurotransmitter System. *GPCR Pathways.* 2010. Issue No4. p.2-4. Available on: www.alomone.com

Meiri N, Sun MK, Segal Z, Alkon DL. Memory and long-term potentiation (LTP) dissociated: normal spatial memory despite CA1 LTP elimination with Kv1.4 antisense. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Dec 8;95(25):15037-42

Metz AE, Jarsky T, Martina M, Spruston N. R-type calcium channels contribute to afterdepolarization and bursting in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci.* 2005 Jun 15;25(24):5763-73.

Minkeviciene R, Rheims S, Dobszay MB, Zilberter M, Hartikainen J, Fülöp L, Penke B, Zilberter Y, Harkany T, Pitkänen A, Tanila H. Amyloid beta-induced neuronal hyperexcitability triggers progressive epilepsy. *J Neurosci.* 2009 Mar 18;29(11):3453 -62.

Milner B, Squire LR, Kandel ER. Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron.* 1998 Mar;20(3):445-68. Review.

Mintz IM, Bean BP. GABAB receptor inhibition of P-type Ca²⁺ channels in central neurons. *Neuron.* 1993 May;10(5):889-98.

Misgeld U, Bijak M, Jarolimek W. A physiological role for GABAB receptors and the effects of baclofen in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol.* 1995 Jul;46(4):423-62. Review.

Molnár Z, Soós K, Lengyel I, Penke B, Szegedi V, Budai D. Enhancement of NMDA responses by beta-amyloid peptides in the hippocampus in vivo. *Neuroreport.* 2004 Jul 19;15(10):1649-52.

Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron.* 1994 Mar;12(3):529-40.

Moreno H, Wu WE, Lee T, Brickman A, Mayeux R, Brown TR, Small SA. Imaging the Abeta-related neurotoxicity of Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 2007 Oct;64(10):1467-77.

Mott DD, Lewis DV. GABAB receptors mediate disinhibition and facilitate long-term potentiation in the dentate gyrus. *Epilepsy Res Suppl.* 1992;7:119-34.

Mucke L, Masliah E, Yu GQ, Mallory M, Rockenstein EM, Tatsuno G, Hu K, Kholodenko D, Johnson-Wood K, McConlogue L. High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J Neurosci.* 2000 Jun 1;20(11):4050-8

Muller D, Lynch G. Synaptic modulation of N-methyl-D-aspartate receptor mediated responses in hippocampus. *Synapse.* 1990;5(2):94-103.

Murchison CF, Schutsky K, Jin SH, Thomas SA. Norepinephrine and β -adrenergic signaling facilitate activation of hippocampal CA1 pyramidal neurons during contextual memory retrieval. *Neuroscience.* 2011 May 5;181:109-16. Epub 2011 Mar 4.

Musiál A, Bajda M, Malawska B. Recent developments in cholinesterases inhibitors for Alzheimer's disease treatment. *Curr Med Chem.* 2007;14(25):2654-79. Review.

Nakayasu H, Nishikawa M, Mizutani H, Kimura H, Kuriyama K. Immunoaffinity purification and characterization of gamma-aminobutyric acid (GABA)_B receptor from bovine cerebral cortex. *J Biol Chem.* 1993 Apr 25;268(12):8658-64.

Navarro-Lopez J. D, Nava M, Sanabria A, Jimenez-Diaz L, De La Fuente A, Criado J. M., Riobos A. S, Heredia M. and Yajeya J. Postsynaptic effects of amyloid-beta peptide on CA3 hippocampal neurons in the rat. *FENS Abstr.*, vol.5, 078.69, 2010.

Nehring RB, Horikawa HP, El Far O, Kneussel M, Brandstätter JH, Stamm S, Wischmeyer E, Betz H, Karschin A. The metabotropic GABAB receptor directly interacts with the activating transcription factor 4. *J Biol Chem.* 2000 Nov 10;275(45):35185-91.

Neves G, Cooke SF, Bliss TV. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat Rev Neurosci.* 2008 Jan;9(1):65-75.

Nishiyama M, Togashi K, Aihara T, Hong K. GABAergic activities control spike timing- and frequency-dependent long-term depression at hippocampal excitatory synapses. *Front Synaptic Neurosci.* 2010 Jun 23;2:22.

Nimmrich V, Ebert U. Is Alzheimer's disease a result of presynaptic failure? Synaptic dysfunctions induced by oligomeric beta-amyloid. *Rev Neurosci.* 2009;20(1):1-12. Review.

Nyakas C, Granic I, Halmy LG, Banerjee P, Luiten PG. The basal forebrain cholinergic system in aging and dementia. Rescuing cholinergic neurons from

neurotoxic amyloid- 42 with memantine. *Behav Brain Res.* 2011 Aug 10;221(2):594 - 603. Epub 2010 May 27.

O'Keefe J, Dostrovsky J. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res.* 1971 Nov;34(1):171 -5.

O'Keefe J. Do hippocampal pyramidal cells signal non-spatial as well as spatial information? *Hippocampus.* 1999;9(4):352 -64. Review.

O'Keefe J, Burgess N. Dual phase and rate coding in hippocampal place cells: theoretical significance and relationship to entorhinal grid cells. *Hippocampus.* 2005;15(7):853-66. Review.

Ogren SO, Eriksson TM, Elvander-Tottie E, D'Addario C, Ekström JC, Svenningsson P, Meister B, Kehr J, Stiedl O. The role of 5-HT(1A) receptors in learning and memory. *Behav Brain Res.* 2008 Dec 16;195(1):54-77. Epub 2008 Feb 20. Review.

Ohmori Y, Hirouchi M, Taguchi J, Kuriyama K. Functional coupling of the gamma-aminobutyric acidB receptor with calcium ion channel and GTP-binding protein and its alteration following solubilization of the gamma-aminobutyric acidB receptor. *J Neurochem.* 1990 Jan;54(1):80-5.

Ondrejcek T, Klyubin I, Hu NW, Barry AE, Cullen WK, Rowan MJ. Alzheimer's disease amyloid beta-protein and synaptic function. *Neuromolecular Med.* 2010 Mar;12(1):13-26. Epub 2009 Sep 16.

Padgett CL, Slesinger PA. GABAB receptor coupling to G-proteins and ion channels. *Adv Pharmacol.* 2010;58:123 -47. Review.

Palop JJ, Chin J, Roberson ED, Wang J, Thwin MT, Bien-Ly N, Yoo J, Ho KO, Yu GQ, Kreitzer A, Finkbeiner S, Noebels JL, Mucke L. A aberrant excitatory neuronal activity and compensatory remodeling of inhibitory hippocampal circuits in mouse models of Alzheimer's disease. *Neuron.* 2007 Sep 6;55(5):697-711

Palop JJ, Mucke L. Amyloid-beta-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. *Nat Neurosci.* 2010 Jul;13(7):812 -8. Review

Papoyan EV. Antidromal and synaptic activation of neurons of the associative parietal cortex of the cat brain elicited by spike activity from the intrinsic nuclei of the pons. *Neurosci Behav Physiol.* 1997 Nov-Dec;27(6):695-701.

Parameshwaran K, Dhanasekaran M, Suppiramaniam V. Amyloid beta peptides and glutamatergic synaptic dysregulation. *Exp Neurol.* 2008 Mar;210(1):7 -13. Epub 2007 Oct 24. Review.

Parra P, Gulyás AI, Miles R. How many subtypes of inhibitory cells in the hippocampus? *Neuron*. 1998 May;20(5):983-93.

Passig Villanueva, C. Los sistemas de memoria. *Revista de Psicología*. Vol V. 1994-1995.

Pedarzani P, Storm JF. Dopamine modulates the slow Ca^{2+} -activated K^{+} current IAHP via cyclic AMP-dependent protein kinase in hippocampal neurons. *J Neurophysiol*. 1995 Dec;74(6):2749-53.

Pedarzani P, Storm JF. PKA mediates the effects of monoamine transmitters on the K^{+} current underlying the slow spike frequency adaptation in hippocampal neurons. *Neuron*. 1993 Dec;11(6):1023-35.

Pikkarainen M, Rönkkö S, Savander V, Insausti R, Pitkänen A. Projections from the lateral, basal, and accessory basal nuclei of the amygdala to the hippocampal formation in rat. *J Comp Neurol*. 1999 Jan 11;403(2):229-60.

Pinard A, Seddik R, Bettler B. GABAB receptors: physiological functions and mechanisms of diversity. *Adv Pharmacol*. 2010;58:231-55. Review.

Pitkänen A, Pikkarainen M, Nurminen N, Ylinen A. Reciprocal connections between the amygdala and the hippocampal formation, perirhinal cortex, and postrhinal cortex in rat. A review. *Ann N Y Acad Sci*. 2000 Jun;911:369-91.

Pitler TA, Alger BE. Activation of the pharmacologically defined M3 muscarinic receptor depolarizes hippocampal pyramidal cells. *Brain Res*. 1990 Nov 26;534(1-2):257-62.

Pitler TA, Alger BE. Cholinergic excitation of GABAergic interneurons in the rat hippocampal slice. *J Physiol*. 1992 May;450:127-42.

Peña F, Gutiérrez-Lerma A, Quiroz-Baez R, Arias C. The role of beta-amyloid protein in synaptic function: implications for Alzheimer's disease therapy. *Curr Neuropharmacol*. 2006 Apr;4(2):149-63.

Peña F, Ordaz B, Balleza-Tapia H, Bernal-Pedraza R, Márquez-Ramos A, Carmona-Aparicio L, Giordano M. Beta-amyloid protein (25-35) disrupts hippocampal network activity: role of Fyn-kinase. *Hippocampus*. 2010 Jan;20(1):78-96

Podlogar M, Dietrich D. Firing pattern of rat hippocampal neurons: a perforated patch clamp study. *Brain Res*. 2006 Apr 26;1085(1):95-101.

Pollard HB, Rojas E, Arispe N. A new hypothesis for the mechanism of amyloid toxicity, based on the calcium channel activity of amyloid beta protein (A beta P) in phospholipid bilayer membranes. *Ann N Y Acad Sci*. 1993 Sep 24;695:165-8. Review.

Poolos NP, Johnston D. Calcium-activated potassium conductances contribute to action potential repolarization at the soma but not the dendrites of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci*. 1999 Jul 1;19(13):5205-12.

Porter RH, Eastwood SL, Harrison PJ. Distribution of kainate receptor subunit mRNAs in human hippocampus, neocortex and cerebellum, and bilateral reduction of hippocampal GluR6 and KA2 transcripts in schizophrenia. *Brain Res*. 1997 Mar 21;751(2):217-31.

Porter JT, Cauli B, Tsuzuki K, Lambolez B, Rossier J, Audinat E. Selective excitation of subtypes of neocortical interneurons by nicotinic receptors. *J Neurosci*. 1999 Jul 1;19(13):5228-35.

Potter PE, Rauschkolb PK, Pandya Y, Sue LI, Sabbagh MN, Walker DG, Beach TG. Pre- and post-synaptic cortical cholinergic deficits are proportional to amyloid plaque presence and density at preclinical stages of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 2011 Jul;122(1):49-60. Epub 2011 May 1

Pypali GK, Sik A, Penttonen M, Buzsaki G, Turner DA. Dendritic properties of hippocampal CA1 pyramidal neurons in the rat: intracellular staining in vivo and in vitro. *J Comp Neurol*. 1998 Feb 16;391(3):335-52.

Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Katz LC, LaMantia AS, McNamara JO, Williams SM. *Neuroscience* 2th Edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates, Inc.; c2001.

Available in:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=neurosci.TOC&depth=2>

Racca C, Stephenson FA, Streit P, Roberts JD, Somogyi P. NMDA receptor content of synapses in stratum radiatum of the hippocampal CA1 area. *J Neurosci*. 2000 Apr 1;20(7):2512-22.

Raiteri M, Bonanno G, Gemignani A, Pende M, Vellebuona F, Lanza M. Pharmacologically distinct GABAB receptor subtypes modulate neurotransmitter release in the rat brain cortex. *Adv Biochem Psychopharmacol*. 1992;47:205-16.

Raiteri M. Presynaptic metabotropic glutamate and GABAB receptors. *Handb Exp Pharmacol*. 2008;(184):373-407. Review.

Ramsden M, Plant LD, Webster NJ, Vaughan PF, Henderson Z, Pearson HA. Differential effects of unaggregated and aggregated amyloid beta protein (1-40) on K(+) channel currents in primary cultures of rat cerebellar granule and cortical neurones. *J Neurochem*. 2001 Nov;79(3):699-712.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. *Pharmacology*, 5th edition. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2003

Reinhart PH, Chung S, Levitan IB. A family of calcium-dependent potassium channels from rat brain. *Neuron*. 1989 Jan;2(1):1031-41.

Reitz C, Brayne C, Mayeux R. Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*. 2011 Mar;7(3):137-52. Epub 2011 Feb 8. Review

Ribak CE, Shapiro LA. Ultrastructure and synaptic connectivity of cell types in the adult rat dentate gyrus. *Prog Brain Res*. 2007;163:155 -66. Review.

Rivera C, Voipio J, Payne JA, Ruusuvuori E, Lahtinen H, Lamsa K, Pirvola U, Saarma M, Kaila K. The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature*. 1999 Jan 21;397(6716):251 -5.

Rodríguez-Moreno A. [The role of kainate receptors in the regulation of excitatory synaptic transmission in the hippocampus]. *Rev Neurol*. 2006 Mar 1 -15;42(5):282-7. Review

Romei C, Luccini E, Raiteri M, Raiteri L. GABA(B) presynaptic receptors modulate glycine exocytosis from mouse spinal cord and hippocampus glycinergic nerve endings. *Pharmacol Res*. 2009 Mar;59(3):154-9. Epub 2008 Dec 24.

Rondard P, Huang S, Monnier C, Tu H, Blanchard B, Oueslati N, Malhaire F, Li Y, Trinquet E, Labesse G, Pin JP, Liu J. Functioning of the dimeric GABA(B) receptor extracellular domain revealed by glycan wedge scanning. *EMBO J*. 2008 May 7;27(9):1321-32. Epub 2008 Apr 3.

Rush DK, Aschmies S, Merriman MC. Intracerebral beta -amyloid(25-35) produces tissue damage: is it neurotoxic? *Neurobiol Aging*. 1992 Sep-Oct;13(5):591-4.

Saint Marie RL, Miller EJ, Breier MR, Weber M, Swerdlow NR. Projections from ventral hippocampus to medial prefrontal cortex but not nucleus accumbens remain functional after fornix lesions in rats. *Neuroscience*. 2010 Jun 30;168(2) :498-504. Epub 2010 Mar 23

Sago H, Carlson EJ, Smith DJ, Kilbridge J, Rubin EM, Mobley WC, Epstein CJ, Huang TT. Ts1Cje, a partial trisomy 16 mouse model for Down syndrome, exhibits learning and behavioral abnormalities. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 May 26;95(11):6256-61.

Sanchez-Rodriguez JL, Torrellas-Morales C. [A review of the construct of mild cognitive impairment: general aspects]. *Rev Neurol*. 2011 Mar 1;52(5):300 -5.

Santos-Torres J, Fuente A, Criado JM, Riobos AS, Heredia M, Yajeya J. Glutamatergic synaptic depression by synthetic amyloid beta -peptide in the medial septum. *J Neurosci Res*. 2007 Feb 15;85(3):634 -48

Savi N, Pedarzani P, Sciancalepore M. Medium afterhyperpolarization and firing pattern modulation in interneurons of stratum radiatum in the CA3 hippocampal region. *J Neurophysiol*. 2001 May;85(5):1986-97.

Scanziani M, Salin PA, Vogt KE, Malenka RC, Nicoll RA. Use-dependent increases in glutamate concentration activate presynaptic metabotropic glutamate receptors. *Nature*. 1997 Feb 13;385(6617):630-4.

Scanziani M. GABA spillover activates postsynaptic GABA(B) receptors to control rhythmic hippocampal activity. *Neuron*. 2000 Mar;25(3):673-81.

Schliebs R, Arendt T. The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *Behav Brain Res*. 2011 Aug 10;221(2):555-63. Epub 2010 Dec 9

Schneiderman JH, Cairns A, Sterling CA. Evoked CA3 field potentials corresponding to both EPSPs and IPSPs in hippocampal slice. *Brain Res*. 1992 Jan 13;569(2):287-94.

Schulte MK, Roon RJ, Chalmers DJ, Sunter DC, Koerner JF. Utilization of the resolved L-isomer of 2-amino-6-phosphohexanoic acid (L-AP6) as a selective agonist for a quisqualate-sensitized site in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Brain Res*. 1994 Jun 27;649(1-2):203-7.

Schwegler H, Boldyreva M, Linke R, Wu J, Zilles K, Crusio WE. Genetic variation in the morphology of the septo-hippocampal cholinergic and GABAergic systems in mice: II. Morpho-behavioral correlations. *Hippocampus*. 1996;6(5):535-45.

Schwenk J, Metz M, Zolles G, Turecek R, Fritzius T, Bildl W, Tarusawa E, Kulik A, Unger A, Ivankova K, Seddik R, Tiao JY, Rajalu M, Trojanova J, Rohde V, Gassmann M, Schulte U, Fakler B, Bettler B. Native GABA(B) receptors are heteromultimers with a family of auxiliary subunits. *Nature*. 2010 May 13;465(7295):231-5. Epub 2010 Apr 18.

Scoville WB, Milner B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. 1957. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 2000 Winter;12(1):103-13.

Seeger T, Alzheimer C. Muscarinic activation of inwardly rectifying K(+) conductance reduces EPSPs in rat hippocampal CA1 pyramidal cells. *J Physiol*. 2001 Sep 1;535(Pt 2):383-96.

Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev*. 2001 Apr;81(2):741-66. Review

Selkoe DJ. Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science*. 2002 Oct 25;298(5594):789-91. Review

Selkoe DJ. Soluble oligomers of the amyloid beta-protein impair synaptic plasticity and behavior. *Behav Brain Res*. 2008 Sep 1;192(1):106-13. Epub 2008 Feb 17. Review.

Seress L. Interspecies comparison of the hippocampal formation shows increased emphasis on the regio superior in the Ammon's horn of the human brain. *J Hirnforsch*. 1988;29(3):335-40.

Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, Brett FM, Farrell MA, Rowan MJ, Lemere CA, Regan CM, Walsh DM, Sabatini BL, Selkoe DJ. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med*. 2008 Aug;14(8):837-42

Shen C, Chen Y, Liu H, Zhang K, Zhang T, Lin A, Jing N. Hydrogen peroxide promotes A β production through JNK-dependent activation of gamma-secretase. *J Biol Chem*. 2008 Jun 20;283(25):17721-30. Epub 2008 Apr 23.

Shepherd TM, Ozarslan E, King MA, Mareci TH, Blackband SJ. Structural insights from high-resolution diffusion tensor imaging and tractography of the isolated rat hippocampus. *Neuroimage*. 2006 Oct 1;32(4):1499-509. Epub 2006 Jun 27

Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, Tsuda T, Mar L, Foncin JF, Bruni AC, Montesi MP, Sorbi S, Rainero I, Pinessi L, Nee L, Chumakov I, Pollen D, Brookes A, Sanseau P, Polinsky RJ, Wasco W, Da Silva HA, Haines JL, Pericak-Vance MA, Tanzi RE, Roses AD, Fraser PE, Rommens JM, St George-Hyslop PH. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*. 1995 Jun 29;375(6534):754-60.

Shi L, Argenta AE, Winseck AK, Brunso-Bechtold JK. Stereological quantification of GAD-67-immunoreactive neurons and boutons in the hippocampus of middle-aged and old Fischer 344 x Brown Norway rats. *J Comp Neurol*. 2004 Oct 18;478(3):282-91.

Shigemoto R, Kinoshita A, Wada E, Nomura S, Ohishi H, Takada M, Flor PJ, Neki A, Abe T, Nakanishi S, Mizuno N. Differential presynaptic localization of metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat hippocampus. *J Neurosci*. 1997 Oct 1;17(19):7503-22.

Shing YL, Rodrigue KM, Kennedy KM, Fandakova Y, Bodammer N, Werkle-Bergner M, Lindenberger U, Raz N. Hippocampal subfield volumes: age, vascular risk, and correlation with associative memory. *Front Aging Neurosci*. 2011 Feb 4;3:2.

Shetty AK, Turner DA. Glutamic acid decarboxylase-67-positive hippocampal interneurons undergo a permanent reduction in number following kainic acid-induced degeneration of CA3 pyramidal neurons. *Exp Neurol*. 2001 Jun;169(2):276-97.

Siarey RJ, Carlson EJ, Epstein CJ, Balbo A, Rapoport SI, Galdzicki Z. Increased synaptic depression in the Ts65Dn mouse, a model for mental retardation in Down syndrome. *Neuropharmacology*. 1999 Dec;38(12):1917-20.

Simon AP, Poindessous-Jazat F, Dutar P, Epelbaum J, Bassant MH. Firing properties of anatomically identified neurons in the medial septum of anesthetized and unanesthetized restrained rats. *J Neurosci*. 2006 Aug 30;26(35):9038-46.

Snyder SH. Drug and neurotransmitter receptors in the brain. *Science*. 1984 Apr 6;224(4644):22-31.

Sohn JW, Lee D, Cho H, Lim W, Shin HS, Lee SH, Ho WK. Receptor-specific inhibition of GABAB-activated K⁺ currents by muscarinic and metabotropic glutamate receptors in immature rat hippocampus. *J Physiol*. 2007 Apr 15;580(Pt. 2):411 -22. Epub 2007 Jan 25

Soghomonian JJ, Martin DL. Two isoforms of glutamate decarboxylase: why? *Trends Pharmacol Sci*. 1998 Dec;19(12):500 -5. Review.

Sotty F, Danik M, Manseau F, Laplante F, Quirion R, Williams S. Distinct electrophysiological properties of glutamatergic, cholinergic and GABAergic rat septohippocampal neurons: novel implications for hippocampal rhythmicity. *J Physiol*. 2003 Sep 15;551(Pt 3):927 -43.

Sperk G, Schwarzer C, Tsunashima K, Fuchs K, Sieghart W. GABA(A) receptor subunits in the rat hippocampus I: immunocytochemical distribution of 13 subunits. *Neuroscience*. 1997 Oct;80(4):987 -1000.

Spruston N, Johnston D. Perforated patch-clamp analysis of the passive membrane properties of three classes of hippocampal neurons. *J Neurophysiol*. 1992 Mar;67(3):508-29.

Squire LR. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol Rev*. 1992 Apr;99(2):195 -231. Review. Erratum in: *Psychol Rev* 1992 Jul;99(3):582.

Staff NP, Jung HY, Thiagarajan T, Yao M, Spruston N. Resting and active properties of pyramidal neurons in subiculum and CA1 of rat hippocampus. *J Neurophysiol*. 2000 Nov;84(5):2398 -408.

Stepanichev MY, Zdobnova IM, Zarubenko II, Moiseeva YV, Lazareva NA, Onufriev MV, Gulyaeva NV. Amyloid-beta(25-35)-induced memory impairments correlate with cell loss in rat hippocampus. *Physiol Behav*. 2004 Feb;80(5):647 -55.

Stewart M, Fox SE. Do septal neurons pace the hippocampal theta rhythm? *Trends Neurosci*. 1990 May;13(5):163 -8.

Storm-Mathisen J, Fonnum F. Localization of transmitter candidates in the hippocampal region. *Prog Brain Res*. 1972;36:41 -58. Review.

Storm JF. Temporal integration by a slowly inactivating K⁺ current in hippocampal neurons. *Nature*. 1988 Nov 24;336(6197):379 -81.

Storm JF. Potassium currents in hippocampal pyramidal cells. *Prog Brain Res*. 1990;83:161-87. Review.

Sultana R, Butterfield DA. Alterations of some membrane transport proteins in Alzheimer's disease: role of amyloid beta-peptide. *Mol Biosyst*. 2008 Jan;4(1):36 -41. Epub 2007 Nov 28. Review.

Sun B, Halabisky B, Zhou Y, Palop JJ, Yu G, Mucke L, Gan L. Imbalance between GABAergic and Glutamatergic Transmission Impairs Adult Neurogenesis in an Animal Model of Alzheimer's Disease. *Cell Stem Cell*. 2009 Dec 4;5(6):624 -33

Swanberg MM, Cummings JL. Diagnosis and Treatment of Dementia . *Neurological Disorders (Second Edition)*, 2003, Pages 311-325

Szabadics J, Soltesz I. Functional specificity of mossy fiber innervation of GABAergic cells in the hippocampus. *J Neurosci*. 2009 Apr 1;29(13):4239 -51.

Sze CI, Troncoso JC, Kawas C, Mouton P, Price DL, Martin LJ. Loss of the presynaptic vesicle protein synaptophysin in hippocampus correlates with cognitive decline in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1997 Aug;56(8):933 -44

Takeda A, Iwaki H, Ando M, Itagaki K, Suzuki M, Oku N. Zinc differentially acts on components of long-term potentiation at hippocampal CA1 synapses. *Brain Res*. 2010 Apr 6;1323:59-64. Epub 2010 Feb 6.

Taniyama K, Niwa M, Kataoka Y, Yamashita K. Activation of protein kinase C suppresses the gamma-aminobutyric acid B receptor-mediated inhibition of the vesicular release of noradrenaline and acetylcholine. *J Neurochem*. 1992 Apr;58(4):1239 -45.

Taniyama K, Niwa M, Kataoka Y, Yamashita K. Inhibition of the vesicular release of neurotransmitters by stimulation of GABAB receptor. *Ann N Y Acad Sci*. 1993 Dec 20;707:496-9.

Tonegawa S, McHugh TJ. The ins and outs of hippocampal circuits. *Neuron*. 2008 Jan 24;57(2):175-7.

Tong XY, Wang XL. [The expression levels of GIRK1 and IRK1 in memory deficit rats]. *Yao Xue Xue Bao*. 2001 Jul;36(7):485-8. Chinese

Tosun D, Schuff N, Mathis CA, Jagust W, Weiner MW; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Spatial patterns of brain amyloid-beta burden and atrophy rate associations in mild cognitive impairment. *Brain*. 2011 Apr;134(Pt 4):1077 -88. Epub 2011 Mar 22.

Treves A, Rolls ET. Computational constraints suggest the need for two distinct input systems to the hippocampal CA3 network. *Hippocampus*. 1992 Apr;2(2):189 -99.

Tsunekawa H, Noda Y, Mouri A, Yoneda F, Nabeshima T. Synergistic effects of selegiline and donepezil on cognitive impairment induced by amyloid beta (25 -35). *Behav Brain Res*. 2008 Jul 19;190(2):224-32. Epub 2008 Mar 18.

Tyzio R, Minlebaev M, Rheims S, Ivanov A, Jorquera I, Holmes GL, Zilberter Y, Ben-Ari Y, Khazipov R. Postnatal changes in somatic gamma-aminobutyric acid signalling in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci*. 2008 May;27(10):2515 -28.

van Groen T, Wyss JM. Extrinsic projections from area CA1 of the rat hippocampus: olfactory, cortical, subcortical, and bilateral hippocampal formation projections. *J Comp Neurol*. 1990 Dec 15;302(3):515-28.

Varadarajan S, Yatin S, Aksenova M, Butterfield DA. Review: Alzheimer's amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress and neurotoxicity. *J Struct Biol*. 2000 Jun;130(2-3):184-208. Review.

Varadarajan S, Kanski J, Aksenova M, Lauderback C, Butterfield DA. Different mechanisms of oxidative stress and neurotoxicity for Alzheimer's A beta(1-42) and A beta(25-35). *J Am Chem Soc*. 2001 Jun 20;123(24):5625-31.

Vertes RP. Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. *Neuroscience*. 2006 Sep 29;142(1):1-20. Epub 2006 Aug 2. Review.

Villette V, Poindessous-Jazat F, Simon A, Léna C, Roullot E, Bellessort B, Epelbaum J, Dutar P, Stéphan A. Decreased rhythmic GABAergic septal activity and memory-associated theta oscillations after hippocampal amyloid-beta pathology in the rat. *J Neurosci*. 2010 Aug 18;30(33):10991-1003.

Vishal S, Sourabh A, Harkirat S. Alois Alzheimer (1864-1915) and the Alzheimer syndrome. *J Med Biogr*. 2011 Feb;19(1):32-3.

Vnek N, Gleason TC, Kromer LF, Rothblat LA. Entorhinal-hippocampal connections and object memory in the rat: acquisition versus retention. *J Neurosci*. 1995 Apr;15(4):3193-9.

Wang H, Golob E, Bert A, Nie K, Chu Y, Dick MB, Mandelkern M, Su MY. Alterations in regional brain volume and individual MRI-guided perfusion in normal control, stable mild cognitive impairment, and MCI-AD converter. *J Geriatr Psychiatry Neurol*. 2009 Mar;22(1):35-45. Epub 2009a Jan 15.

Wang Y, Zhang G, Zhou H, Barakat A, Querfurth H. Opposite effects of low and high doses of Aβ42 on electrical network and neuronal excitability in the rat prefrontal cortex. *PLoS One*. 2009b Dec 21;4(12):e8366.

Wang CY, Hung CH, Lin CS, Lee HH, Yang CH, Jong YJ, Yang SN. Differential alterations of GABA(A) receptor (α1, α2, γ2 subunit) expression and increased seizure susceptibility in rat offspring from morphine-addicted mothers: beneficial effect of dextromethorphan. *Neurosci Lett*. 2011 Feb 1;489(1):5-9.

Washburn MS, Moises HC. Inhibitory responses of rat basolateral amygdaloid neurons recorded in vitro. *Neuroscience*. 1992 Oct;50(4):811-30.

Watkins JC, Krogsgaard-Larsen P, Honoré T. Structure-activity relationships in the development of excitatory amino acid receptor agonists and competitive antagonists. *Trends Pharmacol Sci*. 1990 Jan;11(1):25-33. Review.

Wei G, Shea JE. Effects of solvent on the structure of the Alzheimer amyloid-beta(25-35) peptide. *Biophys J*. 2006 Sep 1;91(5):1638-47. Epub 2006 Jun 9.

Weiss DS, Barnes EM Jr, Hablitz JJ. Whole-cell and single-channel recordings of GABA-gated currents in cultured chick cerebral neurons. *J Neurophysiol*. 1988 Feb;59(2):495-513.

Werner P, Voigt M, Keinänen K, Wisden W, Seeburg PH. Cloning of a putative high-affinity kainate receptor expressed predominantly in hippocampal CA3 cells. *Nature*. 1991 Jun 27;351(6329):742-4.

Wevers A, Witter B, Moser N, Burghaus L, Banerjee C, Steinlein OK, Schütz U, de Vos RA, Steur EN, Lindstrom J, Schröder H. Classical Alzheimer features and cholinergic dysfunction: towards a unifying hypothesis? *Acta Neurol Scand Suppl*. 2000;176:42-8.

White JH, McIlhinney RA, Wise A, Ciruela F, Chan WY, Emson PC, Billinton A, Marshall FH. The GABAB receptor interacts directly with the related transcription factors CREB2 and ATFx. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Dec 5;97(25):13967-72.

Wickman K, Karschin C, Karschin A, Picciotto MR, Clapham DE. Brain localization and behavioral impact of the G-protein-gated K⁺ channel subunit GIRK4. *J Neurosci*. 2000 Aug 1;20(15):5608-15.

Widmer H, Ferrigan L, Davies CH, Cobb SR. Evoked slow muscarinic acetylcholinergic synaptic potentials in rat hippocampal interneurons. *Hippocampus*. 2006;16(7):617-28.

Wimo A, Winblad B, Jönsson L. An estimate of the total worldwide societal costs of dementia in 2005. *Alzheimers Dement*. 2007 Apr;3(2):81-91.

Wisden W, Seeburg PH. A complex mosaic of high-affinity kainate receptors in rat brain. *J Neurosci*. 1993 Aug;13(8):3582-98.

Witter MP, Amaral DG. Entorhinal cortex of the monkey: V. Projections to the dentate gyrus, hippocampus, and subicular complex. *J Comp Neurol*. 1991 May 15;307(3):437-59.

Witter MP. Organization of the entorhinal-hippocampal system: a review of current anatomical data. *Hippocampus*. 1993;3 Spec No:33-44. Review.

Wittner L, Henze DA, Záborszky L, Buzsáki G. Three-dimensional reconstruction of the axon arbor of a CA3 pyramidal cell recorded and filled in vivo. *Brain Struct Funct*. 2007 Jul;212(1):75-83. Epub 2007 Jun 12.

Wittner L, Huberfeld G, Clémenceau S, Eross L, Dezamis E, Entz L, Ulbert I, Baulac M, Freund TF, Maglóczy Z, Miles R. The epileptic human hippocampal cornu ammonis 2 region generates spontaneous interictal-like activity in vitro. *Brain*. 2009 Nov;132(Pt 11):3032-46. Epub 2009 Sep 18.

Wenzel HJ, Buckmaster PS, Anderson NL, Wenzel ME, Schwartzkroin PA. Ultrastructural localization of neurotransmitter immunoreactivity in mossy cell axons and their synaptic targets in the rat dentate gyrus. *Hippocampus*. 1997;7(5):559-70.

Xie X, Crowder TL, Yamanaka A, Morairty SR, Lewinter RD, Sakurai T, Kilduff TS. GABA(B) receptor-mediated modulation of hypocretin/orexin neurones in mouse hypothalamus. *J Physiol*. 2006 Jul 15;574(Pt 2):399-414. Epub 2006 Apr 20.

Xu J, Wojcik WJ. Gamma aminobutyric acid B receptor-mediated inhibition of adenylate cyclase in cultured cerebellar granule cells: blockade by islet-activating protein. *J Pharmacol Exp Ther*. 1986 Nov;239(2):568-73.

Yamaguchi Y, Kawashima S. Effects of amyloid-beta-(25-35) on passive avoidance, radial-arm maze learning and choline acetyltransferase activity in the rat. *Eur J Pharmacol*. 2001 Feb 2;412(3):265-72.

Yankner BA, Duffy LK, Kirschner DA. Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science*. 1990 Oct 12;250(4978):279-82.

Ye CP, Selkoe DJ, Hartley DM. Protofibrils of amyloid beta-protein inhibit specific K⁺ currents in neocortical cultures. *Neurobiol Dis*. 2003 Aug;13(3):177-90.

Ye C, Walsh DM, Selkoe DJ, Hartley DM. Amyloid beta-protein induced electrophysiological changes are dependent on aggregation state: N-methyl-D-aspartate (NMDA) versus non-NMDA receptor/channel activation. *Neurosci Lett*. 2004 Aug 19;366(3):320-5.

Yeckel MF, Kapur A, Johnston D. Multiple forms of LTP in hippocampal CA3 neurons use a common postsynaptic mechanism. *Nat Neurosci*. 1999 Jul;2(7):625-33.

Yu SP, Farhangrazi ZS, Ying HS, Yeh CH, Choi DW. Enhancement of outward potassium current may participate in beta-amyloid peptide-induced cortical neuronal death. *Neurobiol Dis*. 1998 Aug;5(2):81-8.

Yun SH, Gamkrelidze G, Stine WB, Sullivan PM, Pasternak JF, Ladu MJ, Trommer BL. Amyloid-beta1-42 reduces neuronal excitability in mouse dentate gyrus. *Neurosci Lett*. 2006 Jul 31;403(1-2):162-5. Epub 2006 Jun 12.

Zaichenko MI. Comparative analysis of spike activity of neurons in hippocampal field CA1 and CA3 in rats of different typological groups on exposure to emotional stimuli. *Neurosci Behav Physiol*. 2009 Nov;39(9):901-8.